

CAMILA KLOCKER COSTA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Bixa orellana* L., BIXACEAE E
APLICAÇÃO DE SEU ÓLEO EM FORMULAÇÃO COSMÉTICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Marilis D. Miguel

CURITIBA

2007

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

Ao Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, pela amizade, confiança, pelos ensinamentos e constante presença em todos os momentos;

À Prof.^a Dr^a Marilis Dalarmi Miguel, pela co-orientação;

À Prof^a Dr^a Sandra Zanin, e seu esposo Pedro Zanin, por todo carinho e pelas contribuições para melhoria desse trabalho;

À Prof^a Maria Rita Sierakowski e ao Prof. Márcio Chimelli, pelas análises reológicas;

À Prof^a Dr^a Ana Luisa Lacava Lordello, do Departamento de Química da UFPR, pela ajuda na obtenção dos espectros de RMN;

Ao Lauro Mera de Souza, do Departamento de Bioquímica da UFPR, pela análise de cromatografia gasosa;

Ao botânico Gert Hatschbach, pela identificação e depósito do exemplar da espécie em estudo;

Ao Instituto Ambiental do Paraná (IAP), no município de Morretes, na pessoa de Luiz Adão, pelo auxílio na coleta dos frutos;

Ao colega Thiago Alexandre da Silva, pelos espectros de absorção no infravermelho;

À Silmara Costa da Cruz Almeida e Carmen Etsuko Kataoka Higaskino, do Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR), pelo auxílio nos testes antimicrobianos;

À Cosmética Farmácia de Manipulação, pelo apoio para realização desse mestrado;

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que de alguma forma contribuíram para esse trabalho;

A todos os colegas de mestrado pela amizade, em especial à Cláudia Alexandra de Andrade, Miryan Soares Negri e Janaína Fernanda Packer;

Em especial, a minha família, pelo apoio em todas as minhas decisões;

Ao meu marido, meu constante incentivador.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS	x
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3 REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1 <i>Bixa orellana</i> Linné.	6
3.1.1 Família Bixacea	7
3.1.2 Aspectos Botânicos	8
3.1.3 Origem e Aspectos Agronômicos	11
3.1.4 Componentes Químicos	15
3.1.4.1 Bixina e norbixina	17
3.1.5 Usos e Ações Farmacológicas	20
3.2 ANTIOXIDANTES	23
3.2.1 Radicais Livres	23
3.2.2 Carotenóides	28
3.2.3 Tocoferóis e Tocotrienóis	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	33
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	33
4.2.1 Fragmentação das Sementes	33
4.2.2 Extração em Soxhlet	33

4.2.3 Identificação do Cristal	34
4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	35
4.3.1 Reologia	35
4.3.2 Solubilidade	35
4.3.3 Densidade	35
4.3.4 Espalhabilidade	35
4.3.5 Análise em Espectroscopia de Ultravioleta	36
4.3.6 Análise em Espectroscopia de Infravermelho	37
4.4 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS	37
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	37
4.5.1 Método de Difusão em Ágar	38
4.5.1.1 Preparo da amostra	38
4.5.1.2 Preparo dos discos de papel	38
4.5.1.3 Preparo dos meios de cultura	39
4.5.1.4 Preparo do inóculo	39
4.5.1.5 Preparo do teste	39
4.5.2 Método da Concentração Mínima Inibitória	40
4.5.2.1 Preparo do inóculo	40
4.5.2.2 Preparo do teste	40
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	41
4.6.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênico	41
4.6.2 Redução do Radical DPPH	42
4.6.3 Pesquisa de Tocotrienol e Tocoferol	43
4.6.4 Isolamento e Identificação do Composto Antioxidante “X”.....	43
4.7 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO COSMÉTICA	44
5 RESULTADOS	45
5.1 FRAGMENTAÇÃO DAS SEMENTES	45
5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	45
5.2.1 Identificação do Cristal	46
5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	53
5.3.1 Reologia	53
5.3.2 Solubilidade	57

5.3.3 Densidade	57
5.3.4 Espalhabilidade	57
5.3.5 Análise em Espectroscopia de Ultravioleta	58
5.3.6 Análise em Espectroscopia de Infravermelho	60
5.4 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS	61
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	63
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	64
5.6.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênico	64
5.6.2 Redução do Radical DPPH	66
5.6.2.1 Análise qualitativa	66
5.6.2.2 Análise quantitativa	67
5.6.3 Pesquisa de Tocotrienol e Tocoferol	67
5.6.4 Isolamento e Identificação do Composto Antioxidante “X”	69
5.7 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO COSMÉTICA	79
5.7.1 Composição	80
5.7.2 Reologia	81
5.7.3 Espalhabilidade	82
5.7.4 pH	82
5.7.5 Microfotografias	83
6 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	87

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS GERAIS DA FAMÍLIA BIXACEAE	8
FIGURA 2 – ASPECTO DA ÁRVORE DE <i>Bixa orellana</i>	9
FIGURA 3 – FLOR E FRUTO DE <i>Bixa orellana</i>	9
FIGURA 4 – FRUTO BIVALVAR CONTENDO AS SEMENTES DE <i>Bixa orellana</i>	10
FIGURA 5 – (A) SEMENTE INTEIRA E (B) SECÇÃO LONGITUDINAL DA SEMENTE DE <i>Bixa orellana</i>	11
FIGURA 6 – (A) SECÇÃO TRANSVERSAL E (B) ENDOSPERMA DA SEMENTE DE <i>Bixa orellana</i>	11
FIGURA 7 – ASPECTO DA FOLHA DE <i>Bixa orellana</i> COM OIDIO	14
FIGURA 8 – ASPECTO DA FOLHA DE <i>Bixa orellana</i> COM CERCOSPORIOSE	15
FIGURA 9 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DA BIXINA E NORBIXINA	18
FIGURA 10 – BIODÍNTENSE DA BIXINA	19
FIGURA 11 – FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	24
FIGURA 12 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO LICOPENO, β CAROTENO E LUTEINA	29
FIGURA 13 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS	31
FIGURA 14 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE IV DO CRISTAL EM KBr	46
FIGURA 15 – ESPECTRO DE RMN ^1H DO CRISTAL (300MHz, DMSO)	48
FIGURA 16 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO CRISTAL (75MHz, DMSO)	49
FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (DEPT) DO CRISTAL (75MHz, DMSO)	50
FIGURA 18 – MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL ^1H - ^1H (COSY) DO CRISTAL (300MHz, DMSO)	51
FIGURA 19 – MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL ^1H - ^{13}C	

(HMQC) DO CRISTAL (DMSO)	52
FIGURA 20 – COMPORTAMENTO REOLÓGICO DO ÓLEO	56
FIGURA 21 – ESPALHABILIDADE DO ÓLEO DE <i>Bixa orellana</i>	57
FIGURA 22 – ESPALHABILIDADE DO ÓLEO DE AMÊNDOAS	58
FIGURA 23 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE UV DO ÓLEO	59
FIGURA 24 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE IV DO ÓLEO EM KBr	60
FIGURA 25 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÁCIDOS LINOLÉICO E α LINOLÊNICO	62
FIGURA 26 – FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO	65
FIGURA 27 – REDUÇÃO DO RADICAL DPPH	66
FIGURA 28 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO ÓLEO UTILIZANDO VITAMINA C COMO PADRÃO	66
FIGURA 29 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO ÓLEO DE UTILIZANDO PADRÃO COMERCIAL DE TOCOTRIENOL / TOCOFEROL.....	68
FIGURA 30 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DO ÓLEO MARCANDO TOCOTRIENOL / TOCOFEROL	69
FIGURA 31 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA REVELAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DO ÓLEO	69
FIGURA 32 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE FRAÇÕES SUBSEQÜENTES OBTIDAS DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA	70
FIGURA 33 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO COMPOSTO “X” ISOLADO	71
FIGURA 34 – ESPECTRO DE RMN ^1H DO COMPOSTO “X” (300MHz, CDCl_3)	73
FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO “X” (75MHz, CDCl_3)	74
FIGURA 36 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (DEPT) DO COMPOSTO “X” (75MHz, CDCl_3)	75
FIGURA 37 – MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL ^1H - ^1H (COSY)	

DO COMPOSTO “X” (300MHz, CDCl ₃)	76
FIGURA 38 – MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL ¹ H - ¹³ C (HMQC) DO COMPOSTO “X” (CDCl ₃)	77
FIGURA 39 – COMPORTAMENTO REOLÓGICO DAS FÓRMULAS 1 E 2 ..	81
FIGURA 40 – ESPALHABILIDADE DAS FÓRMULAS 1 E 2	82
FIGURA 41 – MICROFOTOGRAFIAS DA FÓRMULA 1	83
FIGURA 42 – MICROFOTOGRAFIAS DA FÓRMULA 2	83

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	COMPORTAMENTO NEWTONIANO	55
GRÁFICO 2 –	COMPORTAMENTO NÃO-NEWTONIANO	55
GRÁFICO 3 –	ATIVIDADES ANTIOXIDANTES RELATIVAS DETERMINADAS PELO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNICO ...	64

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 –	MECANISMO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	25
QUADRO 2 –	EQUAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE	36
QUADRO 3 –	EQUAÇÃO PARA CÁLCULO DE FPS PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	36
QUADRO 4 –	CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA PELO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNICO	41
QUADRO 5 –	CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH	42
QUADRO 6 –	EQUAÇÃO DO FLUXO DE NEWTON	54
QUADRO 7 –	LEI DAS POTÊNCIAS	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO	7
TABELA 2 –	COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE SEMENTES DE <i>Bixa orellana</i>	16
TABELA 3 –	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ^1H E DE ^{13}C DO CRISTAL E CORRELAÇÃO HMQC	53
TABELA 4 –	TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO	62
TABELA 5 –	COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ^1H , ^{13}C E CORRELAÇÃO HMQC E COSY DO COMPOSTO “X” COM DADOS DE LITERATURA	78
TABELA 6 –	FÓRMULAS DE GLOSS LABIAL	80

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	– graus Celsius
C	– carbono
cm	– centímetro
cP	– centi Poise
g	– grama
H	– hidrogênio
Hz	– hertz
M	– molar
mg	– miligrama
MHz	– megahertz
min	– minutos
mL	– mililitros
mm	– milímetro
nm	– nanômetros
®	– marca registrada
η	– viscosidade
λ	– comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	– comprimento de onda máximo
γ	– taxa de cisalhamento
μg	– microgramas
μL	– microlitro
μm	– micrômetro
μM	– micromols
T	– tensão de cisalhamento
AA	– atividade antioxidante
AAL	– ácido α -linolênico
AAR	– atividade antioxidante relativa

ABIHPEC	– Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal
Abs	– absorbância
ADH	– ácido docosahexaenóico
AEP	– ácidos eicosapentaenóico
AGE	– ácido graxo essencial
AGS	– ácido graxo saturado
AGMI	– ácido graxo monoinsaturado
AGPI	– ácido graxo poliinsaturado
AL	– ácido linoléico
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARA	– ácido aracdônico
ATCC	– <i>American Type Culture Collection</i>
BHA	– butil hidroxianisol
BHT	– butil hidroxitolueno
CCD	– cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	– clorofórmio deuterado
CG-EM	– cromatografia gasosa associada ao espectro de massa
CI	– <i>Color Index</i>
CLAE	– cromatografia líquida de alta eficiência
CMI	– concentração mínima inibitória
COSY	– <i>Correlated Spectroscopy</i>
DEPT	– <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	– dimetilsulfóxido
DNA	– ácido desoxirribonucléico
DPPH	– 1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EMBRAPA	– Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROs	– espécies reativas de oxigênio
FAO	– Food and Agriculture Organization
FPS	– fator de proteção solar
HDL	– <i>high density protein</i>
IAP	– Instituto Ambiental do Paraná
IV	– Infravermelho

KBr	– brometo de potássio
NBT	– azul de nitrotetrazólio
OE	– óxido de etileno
OMS	– Organização Mundial da Saúde
pH	– potencial hidrogeniônico
p/p	– peso / peso
qsp	– quantidade suficiente para
R _f	– tempo de retenção
RMN ¹ H	– ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	– ressonância magnética nuclear de carbono 13
TECPAR	– Instituto Tecnológico do Paraná
TMS	– tetrametilsilano
UFC	– unidades formadoras de colônia
UV	– raios ultravioleta
UVB	– raios ultravioleta B

RESUMO

Bixa orellana é uma planta nativa do Brasil, desenvolvendo-se também em outras regiões da América do Sul e Central. É cultivada em países tropicais como Peru, México, Equador, Indonésia, Índia, Quênia e leste da África. Por meio de suas sementes produz-se um dos corantes mais utilizados mundialmente, principalmente em produtos alimentícios, mas também nas indústrias têxteis e cosméticos. O objetivo desse trabalho foi contribuir para o estudo fitoquímico de *B. orellana*, e agregar valor ao seu óleo desenvolvendo uma formulação cosmética. A extração foi realizada em Soxhlet, sendo a fração hexânica constituída pelo óleo, e da fração clorofórmica obteve-se a bixina, apocarotenóide majoritário de *B. orellana* e principal constituinte do seu corante. Algumas análises foram realizadas no óleo, dentre elas solubilidade, densidade, espalhabilidade, espectroscopia de absorção de ultravioleta e infravermelho. Também foi avaliada sua reologia, atividade antioxidante e antimicrobiana. Dentre os ácidos graxos identificados estão o linoléico, oléico, e também o ácido aracdônico. O fator de proteção solar do óleo foi determinado por espectrofotometria, obtendo-se um valor 6. Pelos ensaios de difusão em ágar e concentração mínima inibitória, não foi possível observar ação antimicrobiana do óleo para as cepas testadas. Em relação aos compostos antioxidantes, foi pesquisada a presença de tocoferóis e tocotrienóis, os quais foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência. Por RMN ^1H e ^{13}C também foi identificado o composto δ tocotrienol. Duas fórmulas labiais foram propostas, e nelas realizaram-se os ensaios reológicos, espalhabilidade e pH. Suas estabilidades foram avaliadas por meio de microfotografias.

Palavras-chave: *Bixa orellana*, óleo, atividade antioxidante, fator de proteção solar, tocotrienol

ABSTRACT

Bixa orellana is a native plant of Brazil, also growing in other areas of South and Central America. It is cultivated at tropical countries like Peru, Mexico, Ecuador, Indonesia, India, Kenya and east of Africa. Through its seed, one of the colors more globally used is produced, mainly in nutritious products, but also in the textile and cosmetic industries. The objective of that research was to contribute for the phytochemistry study of *B. orellana*, and to join value to it oil developing a cosmetic formulation. The extraction was accomplished in Soxhlet, being the hexane fraction constituted by the oil, and of the chlorophorm fraction it was obtained the bixina, majority apocarotenoid of *B. orellana* and main representative of its color. Some analyses were accomplished in the oil, among them solubility, density, spreading, absorption spectral of ultraviolet and infrared. Its was also evaluated its rheological, antioxidant and antibacterial activity. Among the fat acids identified it is the linoleic, oleic, and also the aradonic acid. The solar protection factor of the oil has been determined by spectrometrical method, being obtained a value of six. For the diffusion rehearsals in agar and minimum inhibitory concentration, it was not possible to observe antibacterial action of the oil for the tested stumps. In relation to the antioxidant compositions, it has been researched the tocopherols and tocotrienols presence, which were identified for high performance liquid chromatography. For NMR ^1H and ^{13}C was also identified the compound δ tocotrienol. Two labial formulas have been proposed, and in them they took place the rheological rehearsals, spreading, pH and their homogeneity have been appraised through microphotographs.

Key words: *Bixa orellana*, oil, antioxidant activity, solar protection factor, tocotrienol

1 INTRODUÇÃO

A utilização de compostos naturais de origem mineral, animal ou vegetal em produtos alimentícios, cosméticos e medicamentos vem de longa data. Há milênios se têm registros escritos de antigas civilizações egípcias e chinesas que faziam o uso desses produtos. Nos dias atuais, tem-se visto um retorno à procura por produtos chamados “naturais”, que na verdade nunca deixaram de existir. Basta analisar a composição de muitos medicamentos, já que quase 50% destes, em uso clínico, apresentam compostos de origem natural em sua fórmula. Além disso, não somente as plantas, mas também seus subprodutos estão sendo largamente utilizados como conservantes, aromatizantes e corantes em diversas preparações cosméticas e alimentícias (PERECIN; BOVI; MAIA, 2002).

Somente 14% dos recursos vegetais que estão disponíveis são conhecidos adequadamente. O Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta, pois das 250 mil espécies existentes, aproximadamente 55 mil estão aqui, e destas apenas 2% são conhecidas (BABY et al., 2005). Dentro deste contexto, torna-se importante um estudo mais detalhado de algumas espécies nativas popularmente conhecidas, como é o caso de *Bixa orellana*, mais conhecida no Brasil como urucum.

Bixa orellana é uma planta nativa do Brasil, desenvolvendo-se também em outras regiões da América do Sul e Central. É cultivada em países tropicais como Peru, México, Equador, Indonésia, Índia, Quênia e leste da África (ELIAS et al., 2002).

No Brasil, as melhores sementes eram provenientes do Pará e Amazonas. Mas de acordo com FURTADO (2003), os principais cultivares estão em São Paulo, onde se encontram sementes com maior teor de bixina, o principal constituinte do corante. Há também cultivos nos estados do Paraná e Rondônia.

Por meio da semente dessa planta, produz-se um dos corantes mais utilizados mundialmente, principalmente em produtos alimentícios, mas também nas indústrias têxteis, de tintas e cosméticos. Seu uso tem sido estimulado em razão da proibição do uso de corantes sintéticos nas indústrias de alimentos e cosméticos, sendo um dos poucos aceitos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pois além de não ser tóxico, parece não alterar o valor dos alimentos (BASTOS et al., 1999). Outro dado interessante é que 70% de todo o corante natural consumido no mundo

é originado do urucum (AGRICULTURA DA PARAÍBA GERA RIQUEZA PARA EXPORTADORES, 2005).

No mercado brasileiro de sementes de *B. orellana*, cerca de 60% destas são destinadas à produção e comércio de colorífico, 25% para exportação *in natura* e 15% para fabricação de corantes. Segundo CARVALHO (1999), em 1999 o Brasil forneceu cerca de 40% da produção mundial de sementes, exportando principalmente para Estados Unidos, Inglaterra, França e Japão.

Ainda em 1999, o Brasil chegou a produzir de 10 mil a 12 mil toneladas de sementes. Em 2001, o consumo de colorífico somente na região Nordeste, em razão de sua culinária, foi em média de 1,6 mil toneladas (FRANCO, [2002?]). De acordo com GIULIANO, ROSATI e BRAMLEY (2003), a América Latina produzia em 2003 cerca de 60% da produção total mundial de urucum, seguida da África e da Ásia.

No Brasil, em 2005, somente a Paraíba foi responsável por 15,4% da produção nacional, o que é um valor significativo, considerando que o Brasil, nesse mesmo ano, forneceu 85% do total de frutos colhidos no mundo. Porém, a Paraíba quase não exporta as sementes da planta, pois os produtores não possuem cooperativas nem uma forma de organização para isso. As vendas são feitas para “atravessadores”, pessoas que revendem as sementes para indústrias de extração de bixina dos Estados Unidos e Europa por um preço que pode ser até 50 vezes maior que o valor da compra (AGRICULTURA..., 2005).

Atualmente, no Brasil, muitas indústrias atuam no comércio de corantes, destacando-se a Christian Hansen, IFF, Firace, Quest, Biacon, Adicon, Liotécnica, dentre outras. Do total dessas empresas, aproximadamente 54% produzem corantes naturais e 12% corantes artificiais. Dentre os naturais, o proveniente de *B. orellana* é, sem dúvida, o mais produzido e utilizado (FRANCO, [2002?]).

A aplicação desse corante em produtos cosméticos já foi legalmente permitida em uma resolução normativa publicada em 1978 pela Câmara Técnica de Cosméticos do Conselho Nacional de Saúde, que o classifica como corante orgânico natural possível de ser aplicado em produtos para uso na cavidade oral, nos lábios e como corante para uso externo que pode ter contato prolongado com a pele e cabelos (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1978). Em 2000, a resolução nº 79 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou que esse mesmo

corante é permitido para todos os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (ANVISA, 2000).

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal (ABIHPEC), em 2004 o mercado mundial de cosméticos cresceu 9,4% em dólares, enquanto que o Brasil chegou a 24,3%, atingindo a sexta posição mundial, logo após os Estados Unidos, Japão, França, Alemanha e Inglaterra. No Brasil, estima-se que o faturamento de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos em 2005 foi 14,5% maior em relação a 2004, e para 2006 esperava-se atingir mais de R\$ 16 bilhões, que corresponde a um crescimento de 10%. Além do mercado interno, as exportações do setor cresceram 22,8% em 2005, devido principalmente à alta qualidade dos produtos e também à diversidade de matérias-primas encontradas aqui (SILVA, 2006).

Uma parceria interessante que envolve a aplicação cosmética de subprodutos de *B. orellana* acontece desde 1993 entre a tribo indígena Yawanawa, do Acre, e a indústria multinacional de cosméticos Aveda, dos Estados Unidos. Os indígenas exportam em média quatro toneladas de sementes por ano para a multinacional, que pagava, em 2005, R\$ 25 mil pelo produto. A indústria possui uma linha de cosméticos para maquiagem denominada “Uruku”, que contém substâncias extraídas da semente dessa planta na sua composição (KALIL, 2005).

Tendo em vista o crescimento do setor cosmético, a pesquisa de novas matérias-primas naturais vem sendo bastante valorizada, em especial quando se trata da utilização de plantas amazônicas.

A biodiversidade amazônica é vista com muito interesse, sobretudo no mercado internacional, em razão da riqueza de constituintes das plantas brasileiras. Além disso, os produtos cosméticos fabricados com ativos amazônicos são considerados competitivos no mercado externo, pois possuem qualidade e têm valor adequado para esse setor. Com isso, os ingredientes amazônicos, aos poucos, estão se incorporando em linhas de cosméticos internacionais. A imagem do Brasil com o tempo está sendo relacionada a outros valores, muitas vezes não mais sendo lembrado como um país que desmata e queima suas florestas, sem devolver à natureza o que lhe foi tirado, mas passa a ser reconhecido como exportador de ativos que, além do apelo por serem exóticos, têm eficácia comprovada e são extraídos de maneira responsável (FRANQUILINO, 2006).

Portanto, a proposta desse trabalho é estudar não somente o corante de *B. orellana*, já bastante explorado, mas principalmente o óleo obtido de suas sementes, cujas pesquisas, embora escassas, já trazem informações que justificam sua aplicação em formulações cosméticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o estudo fitoquímico de *Bixa orellana* L. Bixaceae, e aplicar seu óleo em formulação cosmética.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o óleo de *B. orellana* a partir de sementes por Soxhlet;
- Determinar as propriedades físico-químicas como solubilidade, densidade, espalhabilidade, e reologia do óleo, bem como analisá-lo em espectroscopia de ultravioleta e infravermelho;
- Calcular o fator de proteção solar espectrofotométrico do óleo;
- Identificar seus ácidos graxos;
- Pesquisar sua atividade antimicrobiana;
- Pesquisar sua atividade antioxidante;
- Desenvolver uma fórmula cosmética.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Bixa orellana* Linné.

Bixa orellana Linné., é um arbusto que foi assim denominado como uma forma de homenagem ao primeiro botânico e explorador que o estudou, Francisco de Orellana. O nome popular urucum provém do vocábulo tupi *uru-ku*, que significa amarelo. Tem-se conhecimento que os índios do Brasil, do México, Peru e Porto Rico, onde essa espécie é conhecida como achiote, untavam-se com seu óleo e sementes para participar de ritos cerimoniais, além de usar essa mistura como camuflagem, que os protegia de picadas de insetos e do sol (ALONSO, 2004). Muitos aborígenes também utilizavam seu corante para tingirem objetos de cerâmica e outros vasos de uso doméstico (CORRÊA; PENNA, 1984).

Os primeiros registros escritos sobre essa planta datam de 1500, na Carta de Pero Vaz de Caminha ao Rei D. Manoel, quando do descobrimento do Brasil. Nessa carta, são feitas várias menções sobre diversas espécies vegetais que aqui existiam, porém a única espécie sobre a qual a identificação não havia dúvidas era o urucum. Caminha descrevia essa planta como “... uns ouriços verdes, de árvores que, na cor, queriam parecer de castanheiros, embora mais e mais pequenos, e eram cheios duns grãos vermelhos pequenos, que, esmagados entre os dedos, faziam tintura vermelha, de que eles andavam tintos. E quanto mais se molhavam, tanto mais vermelhos ficavam” (FILGUEIRAS; PEIXOTO, 2002).

Além de urucum, *B. orellana* apresenta outros nomes populares no Brasil como açafroeira da terra e açafroa, principalmente na Bahia. A sinonímia estrangeira é bem vasta, podendo-se citar bija e achiote, no Peru, Cuba e Porto Rico; axiottl, no México; urucu, na Bolívia; annatto e annatto tree, na Inglaterra; onotto e onotillo, na Venezuela; roucou ou rocouyer, na França; e orleansbaum, na Alemanha (CORRÊA; PENNA, 1984).

As partes utilizadas da planta são principalmente as sementes, mas também raízes e folhas. Das sementes obtém-se o corante vermelho citado em documentos históricos, usado inicialmente pelos indígenas como tinta corporal, e que atualmente tem grande importância na indústria alimentícia e cosmética (ALONSO, 2004).

3.1.1 Família Bixacea

De acordo com ENGLER¹, citado por JOLY (1998), e CRONQUIST (1981), a família Bixaceae é enquadrada taxonomicamente como mostra a tabela 1.

TABELA 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO

	ENGLER	CRONQUIST
Divisão	Angiospermae	-
Classe	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Subclasse	Archichlamydeae	Caryophyllidae
Ordem	Violales	Violales
Família	Bixaceae	Bixaceae
Gênero	<i>Bixa</i>	<i>Bixa</i>
Espécie	<i>B. orellana</i>	<i>B. orellana</i>

FONTES: JOLY, Aylthon Brandão. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 8. ed. São Paulo: Nacional, 1987. p. 482-485;
CRONQUIST, A.J. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University, 1981.

Segundo BARROSO (1978) e JOLY (1987), a família Bixaceae é representada por um único gênero, *Bixa* L., nativa da América tropical e extensamente cultivada.

CORRÊA e PENA (1984), citam algumas espécies do gênero *Bixa*, como *B. acuminata* Bojer., *B. americana* Poiret., *B. orellana* Noronha., *B. platycarpa* Ruiz., *B. tinctoria* Salisb. e *B. urucurana* Wild.

Além destas, há ainda *B. arborea* Huber., *B. excelsa* Gleason & Krukoff., *B. odorata* Ruiz., *B. orellana* var. *leiocarpa* Kuntze., *B. orellana* var. *urucurana* Willd., *B. sphaerocarpa* Triana. e *B. upatensis* Ram. (PLANTAMED, 2005).

As espécies apresentam árvores com folhas alternas, inteiras, e com estípulas² pequenas. As flores são vistosas, pentâmeras e com muitos estames³. A corola⁴ contém geralmente cinco pétalas róseas ou lilás, e carnosas. O ovário é unilocular, formado de dois carpelos⁵. O fruto é seco, bilobado, contendo sementes, ovóides, com tegumento externo carnoso e de pigmentação vermelha (JOLY, 1987).

Algumas características morfológicas da família Bixaceae são representadas na figura 1.

¹ ENGLER, A.; PRANTI, K. **Die natürlichen Pflanzenfamilien**, III, 6, 1895.

² Apêndice da base do pecíolo da folha

³ Órgão masculino da flor

⁴ Conjunto de pétalas da flor

⁵ Faz parte do gineceu, órgão feminino da flor

FIGURA 1 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS GERAIS DA FAMÍLIA BIXACEAE



1. aspecto geral de ramo florífero; 2. flor cortada longitudinalmente; 3. antera vista de frente; 4. antera (porção terminal do estame) vista por trás; 5. detalhe do gineceu; 6. corte transversal ao ovário; 7. frutos; 8. fruto cortado longitudinalmente; 9. diagrama floral de *Bixa orellana*.

FONTE: JOLY (1987), 485

3.1.2 Aspectos Botânicos

De acordo com REVILLA (2001), *B. orellana* é uma árvore pequena ou arbusto com folhagens de três a cinco metros de altura, podendo alcançar 10 metros. O tronco é curto e tem de 20 a 30 cm de diâmetro, casca cinza escuro com lenticelas⁶ em filas verticais. As folhas são alternadas, de 10 a 20 cm de comprimento e 5 a 10 cm de largura, pontiagudas, de cor verde em ambas as faces e com pecíolo alargado. A figura 2 apresenta o aspecto da árvore *B. orellana*.

Conforme mostra a figura 3, as flores podem ser brancas ou rosadas, com 5 pétalas largas e redondas; os estames são numerosos podendo apresentar cor branca ou amarelada. O fruto tem formato de cápsula deiscente⁷, bivalvar, coberta externamente com apêndices flexíveis vermelhos, verdes ou pardos (REVILLA, 2001).

⁶ Pequenos pontos de ruptura no caule, atuando como órgãos de arejamento.

⁷ Órgãos vegetais que se abrem espontaneamente por suturas quando chega a maturação

FIGURA 2 - ASPECTO DA ÁRVORE DE *Bixa orellana*



FONTE: A autora

FIGURA 3 - FLOR E FRUTO DE *Bixa orellana*



FONTE: www.flickr.com

Segundo OLIVEIRA, AKISUE e AKISUE M. (1996), as sementes medem de 0,3 a 0,5 cm de comprimento por 0,2 a 0,3 cm de diâmetro, e o formato varia de piramidal a quase cônico. A quantidade de sementes por cápsula varia conforme o autor: para ALONSO (2004), cada cápsula pode conter de 30 a 40 sementes em média, enquanto que para INGRAM e FRANCIS (1969) pode-se encontrar de 10 a 15. A figura 4 mostra o aspecto do fruto bivalvar contendo as sementes.

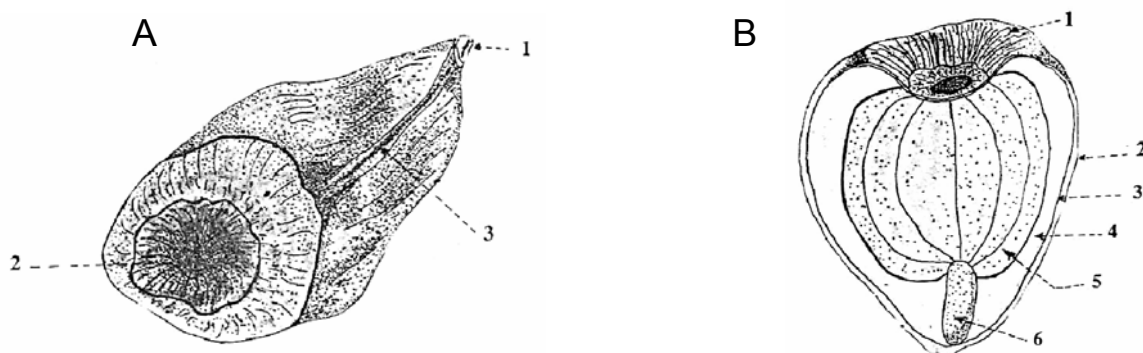
FIGURA 4 – FRUTO BIVALVAR CONTENDO AS SEMENTES DE *Bixa orellana*

FONTE: A autora

Ainda conforme OLIVEIRA, AKISUE e AKISUE M. (1996), a superfície das sementes é quase lisa, apresentando uma depressão em suas faces, sendo percorrida longitudinalmente por um sulco profundo. Apresenta coloração vermelha, e na extremidade afilada há uma região mais clara, denominada de hilo. Na extremidade contrária ao hilo existe uma pequena depressão com um ponto escuro no centro, região conhecida como coroa. O embrião pode ser visto através de uma secção longitudinal da semente, e por um corte transversal pode-se observar um tegumento fino, endosperma volumoso e os dois cotilédones do embrião em forma de lâminas relativamente finas. A semente é quase totalmente envolvida por um arilo aderido ao tegumento, como mostra a figura 5.

Um corte transversal dessa semente permite observar microscopicamente um arilo formado por células retangulares e alongadas tangencialmente, que estão repletas de substâncias alaranjadas. Logo abaixo, encontra-se a região paliádica com paredes espessadas. A próxima é a camada mamilonar, que possui um contorno hexagonal e lúmen pequeno, quando vistas de face. Em seguida, encontra-se a camada obliterada com células “amassadas”, e a camada colunar, que apresenta células com um espessamento que dá um aspecto de uma série de colunas. Por fim, a camada com espessamento em “U”. O tegumento constitui-se das camadas abaixo do arilo e o endosperma apresenta amido e gotículas de óleo (OLIVEIRA, AKISUE, AKISUE M., 1996). A figura 6 mostra algumas dessas características microscópicas.

FIGURA 5 – (A) SEMENTE INTEIRA E (B) SECÇÃO LONGITUDINAL DA SEMENTE DE *Bixa orellana*

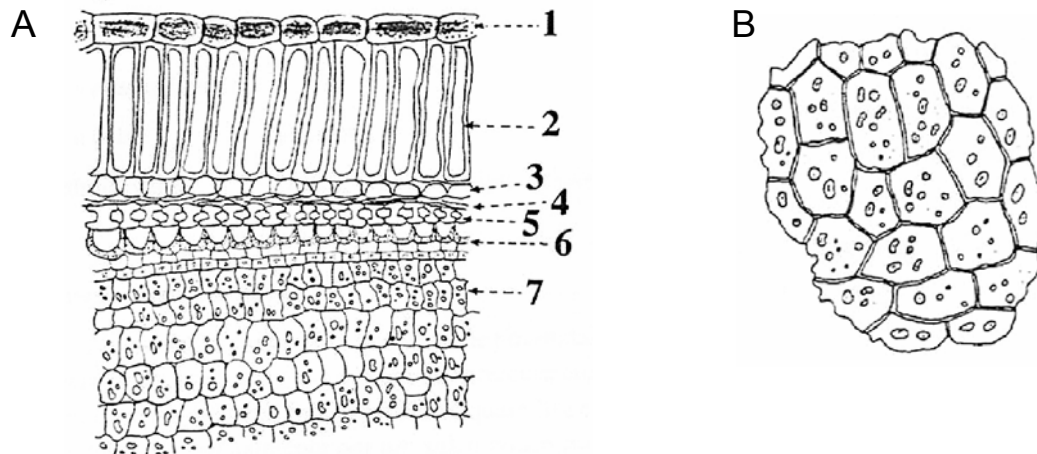


FONTE: OLIVEIRA (1996), 235

(A) 1 – região do hilo; 2 – região da coroa; 3 – sulco longitudinal

(B) 1 – região da coroa; 2 – arilo; 3 – tegumento; 4 – endosperma; 5 – cotilédone; 6 – radícula

FIGURA 6 – (A) SECÇÃO TRANSVERSAL E (B) ENDOSPERMA DA SEMENTE DE *Bixa orellana*



FONTE: OLIVEIRA (1996), 236

(A) 1- arilo; 2 – camada paliádica; 3 – camada mamilonar; 4 – camada obliterada; 5 – camada colunar; 6 – camada com espessamento em U; 7 – endosperma

(B) endosperma com amido e gotículas de óleo

3.1.3 Origem e Aspectos Agronômicos

Bixa orellana é uma planta nativa do Brasil, desenvolvendo-se também em outras regiões da América do Sul e Central. É cultivada em países tropicais como

Peru, México, Equador, Indonésia, Índia, Quênia e leste da África (ELIAS et al., 2002). Segundo ALONSO (2004), os cultivos têm se estendido bastante para as áreas tropicais, pois é uma espécie pouco exigente com o solo na qual se desenvolve, crescendo favoravelmente no solo pouco enriquecido da Amazônia.

Já de acordo com ELIAS et al. (2002), esta espécie desenvolve-se melhor em solos ricos em nutrientes e com pH de 5,5 a 6,0. Como esse tipo de solo enriquecido é difícil de ser encontrado naturalmente, torna-se importante sua fertilização orgânica e mineral.

REBOUÇAS et al. (2006) relatam que o urucuzeiro é uma planta exigente do ponto de vista nutricional, sendo necessária na fase inicial de crescimento a adição de alguns nutrientes como cálcio, nitrogênio, potássio, ferro e manganês. Tendo em vista que a qualidade das sementes está diretamente relacionada com o teor de bixina produzida, esses cuidados no cultivo são de extrema importância. Ainda de acordo com os autores, para as sementes serem classificadas para exportação, o teor de bixina deve ser superior a 2,5%, o que ainda não acontece na média das sementes nacionais.

De acordo com REVILLA (2001), o clima propício para o cultivo de *B. orellana* é o tropical, com temperaturas entre 24 °C e 30 °C. Com relação ao solo, a planta não se desenvolve em áreas encharcadas, e recomendam-se solos pesados com abundante matéria orgânica, boa agregação e permeabilidade. Costuma-se efetuar a plantação no início de temporadas chuvosas. A propagação é feita mediante sementes, mantendo as mudas em sacos plásticos durante três meses, até quando a planta alcançar 20 a 25 cm de altura. A colheita pode ser feita com tesouras podadoras ou manualmente. As folhas podem ser colhidas após 9 meses e os frutos após 16 meses da sementeação, quando estiverem maduros, o que pode ser identificado pela coloração mais escura e consistência mais dura do fruto.

Segundo SATYANARAYANA, PRABHAKAR e RAO (2003), a colheita de sementes deve ser feita após o terceiro ano da plantação, durante um período de 10 a 12 anos. A concentração dos pigmentos variam de 5% nos frutos de formato esférico, 3 a 3,5% no formato cônico, e 1,5 a 2% nos frutos ovais. Os frutos aparecem cerca de 30 dias após a florescência. O rendimento das sementes varia de região para região, pois dependem da variedade da planta, solo e clima, mas pode-se ter uma média de 300 a 900 quilos por hectare.

Ainda de acordo com os mesmos autores, após a colheita dos frutos, estes devem ser secos o mais rápido possível para prevenir germinação das sementes ou contaminação por fungos e bolores. A secagem ao sol pode levar de 3 a 10 dias. O método tradicional para obtenção das sementes é bater os frutos com um bastão contra o chão. Outra forma é utilizar peneiras ou ventilação, mas tendo o cuidado para evitar abrasão intensa e conseqüente perda do pigmento. Imediatamente após limpas, as sementes devem ser cuidadosamente embaladas para evitar contaminação e degradação do pigmento quando exposto à luz.

De acordo com BONFIM et al. (2006), as sementes não devem ser secas diretamente ao sol, em terreiros ou lonas, pois pode provocar perda na qualidade e quantidade de pigmentos. Da mesma forma, para manter a integridade das sementes, sua retirada deve ser realizada em máquinas apropriadas, denominadas descachopadoras. A condição adequada para colheita dos frutos geralmente encontra-se aos 130 dias após a abertura das flores.

Segundo SOLARZANO (1991), *B. orellana* apresenta uma grande variabilidade, desde árvores com caules verdes, flores brancas e frutos amarelos ou verdes, até árvores com caules vermelhos, flores rosas e frutos de cor púrpura. Levando em consideração essas características, o autor agrupa as variedades segundo a forma e cor dos frutos, a quantidade de cerdas e o conteúdo de bixina. Dessa forma, existem as variedades com frutos esféricos, frutos amarelos, alaranjados, verdes, com muitos pêlos ou glabras.

De acordo com a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA, 2002), dentre as inúmeras variedades conhecidas, ainda existe a variedade bico de pato, que foi a primeira introduzida na Bahia, e a peruana paulista, desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). A variedade peruana paulista, conforme FRANCO e SILVA ([2002?]), é a mais produzida no Brasil, apresentando a maior quantidade de bixina.

FRANCO et al. (2002), descrevem algumas pragas e doenças que podem atacar o urucuzeiro. Dentre elas estão as formigas cortadeiras (*Atta sp*), trips (*Selenothrips sp*), o percevejo (*Leptoglossus sp*), cochonilhas (*Pinnaspis sp*), caruncho do urucum (inseto da ordem Coleóptera e família Bruchidae), chupão dos frutos (hemíptero da família Coreideae), ácaros e o bezourinho (*Capsus sp*). O percevejo, o chupão dos frutos e o caruncho são os que atacam diretamente os

frutos, causando danos às sementes e prejudicando a sua comercialização. Dentre as doenças, a principal é a causada pelo fungo oídio bixa (*Oidium sp*), pertencente à subdivisão Ascomycotina, família Erysiphaceae. A doença se manifesta pelo aparecimento de bolores brancos nas folhas e nos pêlos dos frutos da variedade bico de pato, como mostra a figura 7. Um ataque intenso nas folhas pode interferir nas funções metabólicas normais da planta, provocando deficiência no seu desenvolvimento.

FIGURA 7 - ASPECTO DA FOLHA DE *Bixa orellana* COM OÍDIO



FONTE: FRANCO et al (2002), 45

Outro agente causador de doença no urucuzeiro é a espécie *Rhizoctonia solani*, que provoca uma desintegração do colo das mudas, que caem por perderem sua sustentação. A doença atinge a planta somente no estágio de mudas, as quais irão conter o agente causador, que também se encontra nas sementes. Caso não haja controle, as perdas podem chegar à totalidade da plantação.

A cescosporiose, causada por *Cescospora bixae* Allesch e Noack, afeta apenas folhas maduras, e se não houver controle, as folhas secam e caem. Os sintomas são manchas irregulares de cor marrom avermelhada a marrom escura, que são circundadas por um halo amarelo, conforme a figura 8.

Além dessas doenças foliares, há ainda a podridão da raiz, causada pelo fungo *Pythium sp*, que provoca pequenas lesões necróticas de cor marrom escuro. Nas partes aéreas, aparecem manchas amarelas generalizadas, e que quando atingem um estágio avançado, causam a morte da planta (FRANCO et al., 2002)

FIGURA 8 - ASPECTO DA FOLHA DE *Bixa orellana* COM CERCOSPORIOSE

FONTE: FRANCO et al. (2002), 46

3.1.4 Componentes Químicos

Os constituintes químicos de *B. orellana* são muitos, podendo-se citar alguns grupos de substâncias. Dentre os flavonóides, destacam-se o glucosídeo de apigenina, bisulfato de apigenina e hipoaletina (ALONSO, 2004). Há também ácido gálico, ácido alfitólico, óleo essencial, diterpenos (geraniol, geranil), além de vestígios de alcalóides. Dentre os carotenóides estão a bixina e a norbixina, que são os compostos de maior importância comercial, já que compõem a maioria do pigmento vermelho extraído das sementes. Além destes, ainda há orelina, mono e sesquiterpenos, dentre outros carotenóides minoritários (REVILLA, 2001).

PINO e CORREA (2003), identificaram alguns componentes do óleo essencial das sementes de *B. orellana* por meio de cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massa (CG-EM), que se encontram listados com suas respectivas concentrações na tabela 2.

Os componentes majoritários identificados são o acetato de (Z-E)-farnesil, acetato de ocidentalol, espatulenol e ishwarano.

Conforme GALINDO-CUSPINERA, LUBRA e RANKIN (2002), os sesquiterpenos correspondem ao maior grupo de compostos voláteis presentes na planta, constituindo 38% de todos os constituintes voláteis encontrados em extratos oleosos e 89% em extratos aquosos. O β -humuleno está presente em maior quantidade, seguido pelo γ -elemeno e espatulenol. Juntamente com alguns monoterpenos, os sesquiterpenos são descritos como tendo propriedades antimicrobianas. Alguns constituintes possíveis responsáveis por essa característica são β -humuleno, α e β -pineno, β -felandreno, α -terpineol e cariofileno, também

encontrados nas frações voláteis, o que sugere atividade antimicrobiana dessa planta.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE SEMENTES DE *Bixa orellana*

Componente	%	Componente	%
A-tujeno	1.0	Viridifloreno	1.1
A-pineno	2.8	α -selineno	3.1
B-pineno	2.5	β -bisaboleno	1.0
mirreno	0.2	7-epi- α -selineno	0.5
p-cimeno	0.1	cis-calameneno	0.5
limoneno	0.3	δ -cadineno	0.7
p-cimoneno	0.3	α -calacoreno	0.3
crisantenona	2.9	espatulenol	9.6
piperitona	0.5	β -copaen-4- α -ol ⁽¹⁾	0.3
eucarvona	2.3	Humuleno epoxido II	0.4
Δ -elemeno	0.3	acetato de ocidentalol	9.7
A-cubebeno	0.1	acetato de (E)-nerolidol	7.3
A-ylangeno	0.4	(E,E)-farnesol	6.2
B-elemeno	0.3	(E,Z)-farnesol	2.7
longifoleno	0.5	14-hidroxi- α -muuroleno	0.8
Z- β -farneseno	1.5	acetato de (Z,E)-farnesil	11.6
ishwarano	9.1	acetato de (E,E)-farnesil	0.4
valenceno	0.7		

FONTE: PINO e CORREA, 2003

⁽¹⁾ Tentativa de identificação

De acordo com SATYANARAYANA, PRABHAKAR e RAO (2003), os componentes presentes no óleo essencial obtido de sementes secas e frescas de *B. orellana* incluem principalmente hidrocarbonetos (66,5%) e sesquiterpenos oxigenados (12%). Esses autores também identificaram o α -pineno (9,3%), β -pineno (4,8%), α -elemeno (3,3%), ishwarano (30,7%), valenceno (2,7%) e amorfeno (0,2%). KANJILAL e SINGH (1995) citam um rendimento aproximado de 0,07% de óleo essencial das sementes.

COELHO et al. (2003) relatam a presença de um óleo essencial rico em geranilgeraniol, que representa cerca de 1% das sementes secas. De acordo com STRINGHETA (2006), o urucum é a fonte mais abundante desse composto.

Segundo ALONSO (2004), considerando 100 g de sementes secas de *B. orellana* encontra-se de 13 a 17% de proteínas (compostas por aminoácidos como triptofano, lisina, isoleucina, metionina, fenilalanina e treonina); altas concentrações de fósforo e quase ausência de cálcio. Em 100 g de planta fresca encontram-se 0,3g

de lipídeos, 14 g de carboidratos, 0,5 g de fibras, 7 mg de cálcio, 10 mg de fósforo, 0,8 mg de ferro, 0,9 µg de carotenos e 2 mg de ácido ascórbico. As sementes apresentam, além de pentoses, pectinas, proteínas, taninos, alto teor de ácidos graxos poliinsaturados e pequena quantidade de ácido linoléico e oléico. RANJANA et al. (1983) estudaram o óleo das sementes dessa planta, e demonstraram haver presença considerável de ácidos graxos insaturados.

FREGA, MOZZON e BOCCI (1998) identificaram nas sementes de *B. orellana* tocotrienóis, que são potentes antioxidantes e previnem a oxidação do óleo no interior da semente. Enquanto o óleo possui quantidades pequenas de tocoferol, apresenta concentrações maiores de δ -tocotrienóis, além de traços de β -tocotrienol. Nesse estudo foram quantificados 140 mg de tocotrienóis por 100 g de sementes secas (ou 5,2% p/p do extrato lipídico), determinado por CG/MS, e 147 mg por 100 g de sementes (ou 5,5% p/p do extrato lipídico), determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Segundo o autor, nenhuma espécie vegetal parece apresentar concentração semelhante de δ -tocotrienóis.

SATYANARAYANA, PRABHAKAR e RAO (2003) citam outros carotenóides presentes em pequenas quantidades na planta, como β,β -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina, metilbixina e o apocarotenóide metil(9Z)-8'-oxo-6,8'-diapocarotenoide-6-oato.

MERCADANTE, STECK e PFANDER (1997) isolaram e identificaram os seguintes carotenóides a partir de extratos das sementes: metil(all-E)-8'-apo- β -caroteno-8'-oato, metil(7Z,9Z,9'Z)-apo-6'-licopenoato, metil(9'Z)-apo-6'-licopenoato, metil(9'Z)-apo-8'-licopenoato, metil(all-E)-apo-8'-licopenoato e metil(all-E)-apo-6'-licopenoato.

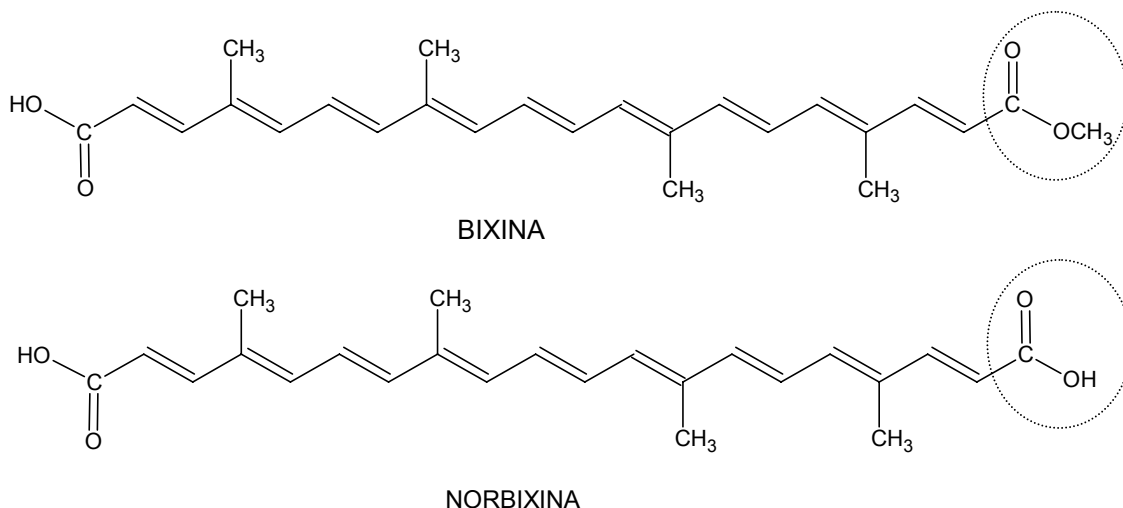
3.1.4.1 Bixina e norbixina

A bixina é um apocarotenóide com 25 carbonos que constitui, em média, 2,5% das sementes secas de *B. orellana*. Removendo-se o grupo metil éster da bixina, tem-se a norbixina, um ácido dicarboxílico (EVANS, 1992), de acordo com a figura 9.

Um apocarotenóide é originado pela clivagem oxidativa dos carotenos, pois cada dupla ligação é susceptível à oxidação. Essa ruptura realiza-se por meio de

enzimas que atuam em pontos específicos da molécula, gerando dois novos carotenos (OLIVEIRA, 2005).

FIGURA 9 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DA BIXINA E NORBIXINA



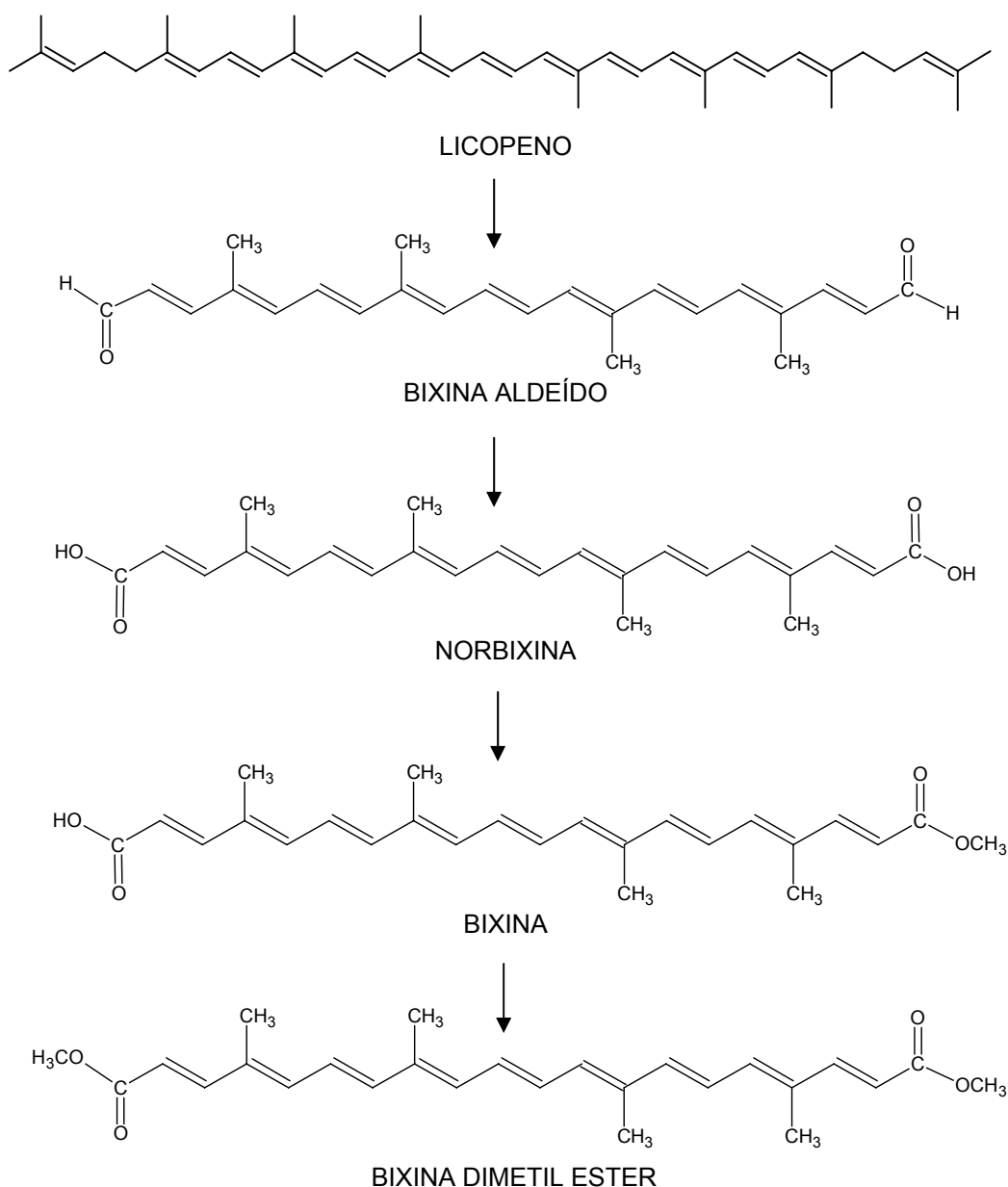
De acordo com SATYANARAYANA, PRABHAKAR e RAO (2003), a bixina (monometiléster do ácido dicarboxílico norbixina) é o principal componente colorido de *B. orellana* (mais de 80% dos carotenóides totais), e devido à intensa insaturação está sujeita também à isomerização. O isômero *cis* (metil-hidrogênio 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno 6,6'-dioato) é o que está presente em maior quantidade na planta, e quando submetido a altas temperaturas se converte na forma *trans*, mais estável (GALINDO-CUSPINERA; LUBRA; RANKIN, 2002).

A *cis*-bixina é solúvel na maioria dos solventes orgânicos polares, onde apresenta uma coloração mais alaranjada, porém insolúvel em óleos vegetais, podendo se converter rapidamente em *trans* isômeros devido a sua instabilidade. A *trans*-bixina tem propriedades semelhantes ao isômero *cis*, porém apresenta coloração vermelha em solução e é solúvel em óleo vegetal. Os isômeros *cis*-bixina, *trans*-bixina, *cis*-norbixina e *trans*-norbixina diferem em algumas características físicas, e as estruturas *trans* não estão presentes naturalmente na planta (SATYANARAYANA, PRABHAKAR; RAO 2003).

No mecanismo da biossíntese da bixina sugere-se a ação de enzimas como dioxigenases, aldeído desidrogenases e metiltransferases que participam de uma série de reações que se processam a partir de um precursor de 40 carbonos. Acredita-se que esse precursor seja o licopeno, uma vez que já se identificaram

traços de derivados dessa molécula acumulados na planta (BOUVIER; DOGBO; CAMARA, 2003). O caminho proposto para biossíntese da bixina é apresentado na figura 10.

FIGURA 10 – BIOSSÍNTESE DA BIXINA



A degradação dos carotenóides de *B. orellana* pode ocorrer após a exposição dos corantes à luz, temperaturas elevadas ou na presença de dióxido de enxofre (SATYANARAYANA, PRABHAKAR; RAO 2003). Os produtos alimentícios produzidos com o corante extraído das sementes, segundo SCOTTER et al. (1994),

devem ser armazenados em condições controladas a fim de evitar processos de degradação e isomerização dos componentes. De acordo com KANJILAL e SINGH (1995), o armazenamento das sementes em condições ambientes provocou uma perda de 40 a 50% no conteúdo de bixina, enquanto que em refrigeração essa perda reduziu-se para 20 a 25%.

A bixina é indexada no Color Index como CI 75120, e pela Comunidade Econômica Européia como EEC E160b e CI Natural Color 4 (OLIVEIRA, 2005).

3.1.5 Usos e Ações Farmacológicas

Desde o começo do século XX, trabalhos científicos já citavam os mais diversos usos de *B. orellana*. AIYAR (1922) justifica seu estudo em razão de seu largo emprego na indústria de laticínios. Já INGRAM e FRANCIS (1969), relatam que países como Estados Unidos, Dinamarca, Holanda e Nova Zelândia utilizavam essa planta como corante de produtos como margarinas, sorvetes e pães; latino-americanos usavam como condimento; indígenas do Brasil aplicavam na pele para repelir insetos; e nas Filipinas, os usos eram mais diversificados, como a fabricação de ceras para pisos, polidores de sapatos e móveis, esmaltes, tinturas, cosméticos, e aplicação nas indústrias de couro e tecidos.

Em razão de ser produzido com baixo custo e devido à ausência de toxicidade, o corante produzido a partir das sementes de *B. orellana* tem se tornado cada vez mais atrativo e conveniente, em substituição aos corantes sintéticos (STRINGHETA, 2006). A demanda por corantes naturais vem crescendo na medida em que se provam a nocividade dos sintéticos, e por essa razão, o corante do urucum é um dos poucos permitidos pela Food and Agriculture Organization (FAO) para aplicação em alimentos (BARBOSA FILHO et al., 1998).

Como corante alimentício, é vastamente aplicado em laticínios, como queijos, margarina e manteiga. No setor de embutidos, a principal utilização é na salsicha, onde se aplica o corante líquido hidrossolúvel norbixina. Há ainda usos nas indústrias de sorvetes, confeitaria e massas (LIMA, 2001).

MIRANDA (2006) ressalta ainda a importância do colorífico como condimento, pois atende a alguns requisitos necessários para essa aplicação, tais

como ser natural, ser facilmente encontrado para compra, ter alta capacidade de corar e ser inócuo.

Considerando a larga aplicação na indústria alimentícia, diversos trabalhos tratam da toxicidade desse corante, e sua inocuidade está comprovada por meio de ensaios de toxicidade e mutagenicidade, mesmo em elevadas concentrações (PAUMGARTTEN et al., 2002; BAUTISTA et al., 2004; AGNER et al., 2004; MIRANDA, 2006; BARBOSA FILHO, 2006). Entretanto, SILVA (2000) realizou ensaios *in vitro* com a bixina, e não descartou uma possível ação carcinogênica desse composto.

GLÓRIA (2006) relata ainda, além da utilização em alimentos, a aplicação do corante em cosméticos, principalmente para proteção da pele dos efeitos nocivos dos raios solares, e também a adição das sementes em ração animal, devido a seu alto valor nutritivo e como fonte de pigmento.

De acordo com FLEISCHER et al. (2003) e ALONSO (2004), o extrato etanólico das folhas do urucum apresentam atividade antimicrobiana contra microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, porém em proporções diferentes. O extrato etanólico das sementes também foi estudado, entretanto não parece apresentar atividade considerável.

Ainda em relação ao efeito antimicrobiano, COELHO et al. (2003), afirmam que extratos obtidos dos frutos, das raízes e das folhas apresentam resultados positivos. Em contraposição, extrato das sementes não demonstrou o mesmo efeito. Foram testadas as atividades antimicrobianas de tinturas de raiz, fruto, folha, flor e caule frente a bactérias e leveduras. Nenhuma das amostras mostrou resultado positivo em relação a leveduras. Considerando todas as tinturas testadas, a da folha foi a que demonstrou maior atividade antimicrobiana, pois inibiu o crescimento de todas as bactérias testadas no estudo, sendo que os maiores halos de inibição observados foram para *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Chromobacterium violaceum* e *Proteus sp*.

Entretanto, GARCIA et al. (2003) estudaram a ação antifúngica de nove espécies de plantas, dentre elas *B. orellana*, e comprovaram a leve atividade de um extrato metanólico de folhas contra *Trychophyton mentagrophytes* e *Trychophyton rubrum*. Nesse mesmo trabalho, os autores citam outro estudo que mostrou atividade contra *Cryptococcus neoformans* e *Microsporum gypseum*. Já ZOLLO et al.

(1998), afirmam que o óleo essencial de folhas de *B. orellana* não apresenta atividade considerável contra *Microsporum gypseum*, bem como contra *Aureobasidium pullulans*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Trichoderma viride*, pois não possui em sua constituição conteúdo considerável de compostos antifúngicos, como por exemplo, o linalol, γ -terpineno, p-cimeno e eugenol.

O efeito hipoglicemiante também tem sido bastante estudado, de acordo com ALONSO (2004). Além disso, as pró-vitaminas A ou carotenos das sementes conferem uma ação antioxidante contra radicais livres e radiação solar. Extratos aquosos de raízes da planta demonstraram efeito de inibição da atividade secretora gástrica, hipotensão arterial e até leve sedação. Extratos aquosos e etanólicos de sementes e folhas parecem inibir a proliferação de células de um tipo de linfoma denominado Molt4. Somente o extrato aquoso de sementes provocou uma diminuição da atividade motora e o estímulo da diurese, porém sem sinais de toxicidade. Outras ações já estudadas são contração uterina, atividade antiinflamatória, cicatrizante tópico, neutralização do veneno de *Bothrops atrox*, eliminando a hemorragia característica da enfermidade, e na fitocosmética, o extrato oleoso, de 2 a 6%, pode ser usado como protetor solar ou bronzeador.

LIMA et al. (2001), estudaram o efeito no metabolismo lipídico causado pelos carotenóides bixina e norbixina, juntamente com a quercetina, um flavonóide também presente no urucum. Concluíram que a bixina foi a substância que melhor apresentou efeito na redução do colesterol-HDL, bem como na manutenção dos níveis dessa lipoproteína. A norbixina e a associação de bixina e quercetina também demonstraram resultados positivos, sugerindo que estas substâncias poderão ser utilizadas futuramente em medicamentos para prevenção de doenças cardíacas.

HARDER (2005) demonstrou a redução dos níveis de colesterol nos ovos de poedeiras alimentadas com ração enriquecida com sementes da planta. Além disso, as gemas apresentaram-se com coloração mais amarela, e os teores de ferro e carotenóides tiveram um acréscimo em relação ao grupo controle.

Outros usos populares incluem as ações antiemética, antidiarréica, antídoto contra cianuretos, para dores renais, malária, queimaduras, asma, como cicatrizante, expectorante, digestivo e diurético (ALONSO, 2004).

CORRÊA (1984), cita o uso da raiz de urucum para problemas digestivos, o pó de sementes como afrodisíaco e a decocção das folhas para combater vômitos na gravidez.

3.2 ANTIOXIDANTES

3.2.1 Radicais Livres

De acordo com GUERRA FILHO e FANAN (1994):

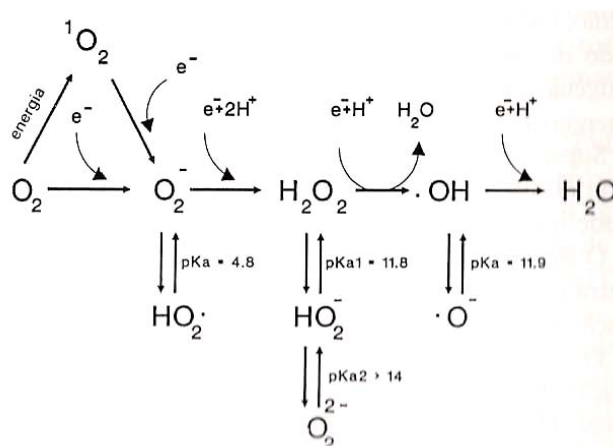
Os radicais livres são moléculas que perderam um elétron de sua camada mais externa, ficando com outro desemparelhado. Por razões quânticas, esta molécula tende a emparelhar este elétron com outro de alguma outra molécula; por isto os radicais livres se tornam tão reativos. A reatividade varia com a estrutura química, temperatura e concentração de suas moléculas no meio de reação. Geralmente apresentam-se em concentrações de nanogramas (parte por bilhão).

A molécula iniciadora do processo de formação de radicais livres é o oxigênio por sua facilidade em reagir. Ao final da respiração aeróbica o oxigênio reduz-se à água, e nessa fase metabólica originam-se espécies altamente reativas, como o superóxido (O_2^-), radical hidroperóxido (HO_2^\bullet) e o radical hidroxila (OH^\bullet). Essas espécies são especialmente importantes nos processos de peroxidação lipídica nas membranas celulares (GUERRA FILHO; FANAN, 1994).

A formação dessas espécies reativas de oxigênio (ERO) pode ser demonstrada pela figura 11.

O oxigênio molecular em seu estado fundamental, ao absorver energia, pode se converter para o estado singlete excitado (1O_2). Tanto essa forma singlete como a forma fundamental do oxigênio, ao absorver um elétron, podem se converter em superóxido (O_2^-). Numa segunda etapa de redução, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado a partir do superóxido, pela absorção de mais um elétron e de 2 H^+ . Essa espécie, após receber um terceiro elétron do processo e mais 1 H^+ , reduz-se ao radical hidroxila ($^\bullet OH$), o qual ao absorver o quarto elétron e 1 H^+ , forma finalmente a molécula da água (H_2O). As espécies HO_2^\bullet e HO_2^- , que correspondem às bases

FIGURA 11 – FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO



FONTE: VOEGELI et al. (1992), 49.

conjugadas do peróxido de hidrogênio, por apresentarem valores extremos de pK_a , embora reativas, são fisiologicamente irrelevantes (VOEGELI et al., 1992).

Cinco tipos de reações podem desencadear a formação de radicais livres na célula. A primeira delas, a homólise unimolecular, ocorre em moléculas como o oxigênio, quando algumas ligações são rompidas gerando uma divisão igual de elétrons para ambos os radicais formados ($O_2 \leftrightarrow O^{\cdot} + O^{\cdot}$). A radiólise é resultado da exposição à energia solar principalmente a raios ultravioleta B (UVB), o que pode causar danos no DNA celular pela ação dos radicais livres formados com as bases puricas e pirimídicas, provocando mutações gênicas. A fotólise é ocasionada pela luz e provoca alterações nas ligações químicas de moléculas, e o que se origina é um oxigênio singlete, iniciador do processo oxidativo. Outra reação é a desencadeada por pirólise, quando fontes como poluentes, óxidos de nitrogênio e enxofre gerados por combustão industrial formam radicais livres na atmosfera. E finalmente as radiações ionizantes, como raios X e cósmicos, que liberam um ou mais elétrons de uma biomolécula, formando um radical extremamente instável, e que é responsável por 10% de toda lesão do DNA causada por agentes não biológicos (GUERRA FILHO; FANAN, 1994).

A peroxidação lipídica, evento importante dos sistemas biológicos mediados por radicais livres, é um processo de reações subseqüentes, que apresenta uma fase de iniciação, propagação e término, conforme o quadro 1.

QUADRO 1 – MECANISMO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

1.	$LH \longrightarrow L^{\bullet}$	INICIAÇÃO
2.	$L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet}$ $LOO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\bullet}$	PROPAGAÇÃO
3.	$R^{\bullet} + AOH \longrightarrow RH + AO^{\bullet}$	TÉRMINO
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> LH: Lipídeo insaturado L[•]: Radical lipídico LOOH: Hidroperóxido lipídico </div> <div> LOO[•]: Radical peroxila R[•]: L[•] ou LOO[•] AOH: Antioxidante </div> </div>		

FONTE: DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA (2005), 76

Nesse mecanismo de peroxidação estão envolvidos os antioxidantes, os quais como definido por VOEGELI et al. (1992): “... são substâncias que retardam ou evitam de forma significativa a oxidação de um substrato”. Eles podem ser divididos em eliminadores das EROs, agentes redutores, enzimas antioxidantes ou quelantes de metais de transição.

Os eliminadores são convertidos, após reação com a ERO, em novos radicais de baixa reatividade. Os agentes redutores (como, por exemplo, o ácido ascórbico) são doadores de elétrons e previnem a oxidação de biomoléculas, e são especialmente predominantes nos espaços intracelulares. A superóxido dismutase, catalase e glutathion peroxidase são importantes enzimas antioxidantes, que agem rapidamente sobre as EROs impedindo a formação de radicais livres. E por fim os quelantes, que atuam pela ligação a metais de transição, os quais são promotores de reações de radicais livres (VOEGELI et al., 1992).

Como já citado por GUERRA FILHO e FANAN (1994), as EROs alteram a maior parte das moléculas biológicas como os ácidos nucleicos, ácido hialurônico, colágeno, enzimas e principalmente os ácidos graxos insaturados. A peroxidação

lipídica provoca a destruição da célula e como conseqüência a morte celular, e com isso atribui-se aos radicais livres a causa de muitas doenças, como o câncer e o mal de Alzheimer, além de atuarem no processo de envelhecimento. O dano causado pelas EROs é denominado estresse oxidativo. O sistema biológico, contudo, apresenta processos enzimáticos e não enzimáticos que são a primeira defesa do organismo contra os radicais livres (VOEGELI et al., 1992).

Ainda de acordo com GUERRA FILHO e FANAN (1994), os mecanismos naturais de neutralização dos radicais livres são conduzidos pelas enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, além de outras moléculas como as vitaminas A, D e C e seus respectivos derivados.

A superóxido dismutase está presente na forma de duas isoenzimas. Uma localiza-se no citoplasma e contém cobre e zinco; a outra apresenta magnésio em sua estrutura e é mitocondrial. Essa enzima é considerada como protetora da longevidade, pois é essencial para todos os organismos que necessitam de oxigênio para sobreviver. Atua sobre os radicais superóxido e hidropéroxido pela conversão destes em peróxido de hidrogênio e oxigênio, conforme as reações: $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ e $\text{HO}_2^\bullet + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_2$.

As catalases, ao contrário, agem sobre outra espécie reativa, o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em duas moléculas de água e uma de oxigênio. Essa enzima está presente nos peroxissomos e catalisa a reação de conversão do peróxido de hidrogênio de forma muito rápida, quase que concomitantemente à formação dessa molécula.

Já a glutathione peroxidase é um complexo de várias enzimas que dependem de selênio para atuarem sobre a redução do peróxido de hidrogênio, de radicais hidropéroxidos e de ácidos graxos peroxidados (ESTEVE; KRIESTEN, 1990).

De acordo com ESTEVE e KRIESTEN (1990), existem diversas teorias sobre os mecanismos do envelhecimento, que vão desde fatores genéticos até ambientais. Para o autor, a teoria que atribui aos radicais livres a causa do envelhecimento é a que melhor se ajusta aos fatos reais de que se tem conhecimento. A neutralização desses radicais, portanto, evita a alteração dos lipídeos de membrana e conseqüentemente modificações ou morte celular.

Levando-se em consideração essas informações, a cosmética dispõe de alguns ativos que possuem poder antioxidante e de prevenção do envelhecimento cutâneo. Dentre eles, três vitaminas apresentam grande capacidade neutralizante de radicais livres: A, C e E. A vitamina A favorece o metabolismo cutâneo correto e mantém a pele em bom estado. A vitamina C, que se constitui do ácido ascórbico hidrossolúvel e seus derivados lipossolúveis, evita processos peroxidativos e age sinergicamente com a vitamina E para formação de fibras colágenas do tecido conjuntivo. Já a vitamina E ou tocoferol atua de um modo peculiar por se intercalar entre os lipídeos da camada mais externa da epiderme formando uma barreira protetora (GUERRA FILHO; FANAN, 1994; ESTEVE; KRIESTEN, 1990).

Além das vitaminas, outras substâncias como os flavonóides oriundos de extratos vegetais também são potentes antioxidantes. Como exemplo, pode-se citar os flavonóides de *Centella asiatica* e de *Gingko biloba* (GUERRA FILHO; FANAN, 1994).

De acordo com DI MAMBRO, MARQUELE e FONSECA (2005), existe atualmente uma tendência em se usar extratos vegetais como antioxidantes por serem de origem natural. Nesses casos, porém, um fator importante a se considerar é se os ativos antioxidantes do extrato continuarão apresentando essa atividade após serem incorporados em uma formulação de uso tópico. Os métodos *in vitro* para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos vegetais baseiam-se na habilidade do antioxidante em seqüestrar radicais livres ou inibir a peroxidação lipídica, e em razão da complexidade de compostos nos extratos, sugere-se avaliar a propriedade anti-*radicais livres* por dois ou mais métodos.

MARTÍNEZ-TOMÉ et al. (2001) apresentam um estudo comparativo da atividade antioxidante de condimentos como colorau (*Bixa orellana*), páprica (*Capsicum annum*), cominho (*Cuminum cyminum*), orégano (*Origanum vulgare*) e açafrão (*Crocus sativus*) contra antioxidantes sintéticos, como butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT) e propil galato. Foram realizados cinco ensaios diferentes, e a conclusão foi que essas especiarias apresentam boas atividades antioxidantes, sendo que em alguns testes sua ação se sobrepõe às substâncias sintéticas. Isso sugere uma vantagem na substituição de compostos sintéticos por naturais em alimentos, uma vez que além de fornecerem cor e aroma, esses

condimentos também irão auxiliar na melhor conservação dos alimentos contra oxidação.

Um exemplo de método *in vitro* para a avaliação da capacidade antioxidante é a redução do NBT (azul de nitro tetrazólio) ou citocromo C pelo superóxido, que é fornecido pelo sistema xantina-xantina oxidase. Outros ensaios *in vitro* baseam-se no seqüestro do radical hidroxila tendo como substrato a desoxirribose; análise da capacidade doadora de H^+ para o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil); inibição da peroxidação lipídica e inibição da redução de quimioluminescência.

Um dos métodos mais adequados para avaliar a capacidade antioxidante em formulações cosméticas é o DPPH, que é um radical estável em solução e que reage com compostos capazes de doar elétrons. Para essa análise utiliza-se uma solução alcoólica de DPPH, que absorve no comprimento de onda próximo de 517nm, e à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado, a absorção decresce e ocorre a mudança de coloração frente às moléculas antioxidantes testadas (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005). Após o equilíbrio da reação mede-se a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

As vantagens desse método são: avaliar uma grande quantidade de amostras em um período curto de tempo e rapidamente; é um método sensível que detecta pequenas concentrações do ativo testado; permite avaliar antioxidantes lipofílicos, já que o solvente do processo é metanol ou etanol. Em contrapartida, o pH do meio reacional, que é em torno de 5,5, é diferente do pH fisiológico, o que se constitui numa desvantagem pela dificuldade de transferir os resultados para as condições *in vivo* (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

3.2.2 Carotenóides

Os carotenóides são o grupo mais importante de cromógenos, ou seja, substâncias que apresentam cores e por essa razão são amplamente utilizados como corantes (COSTA, 1975).

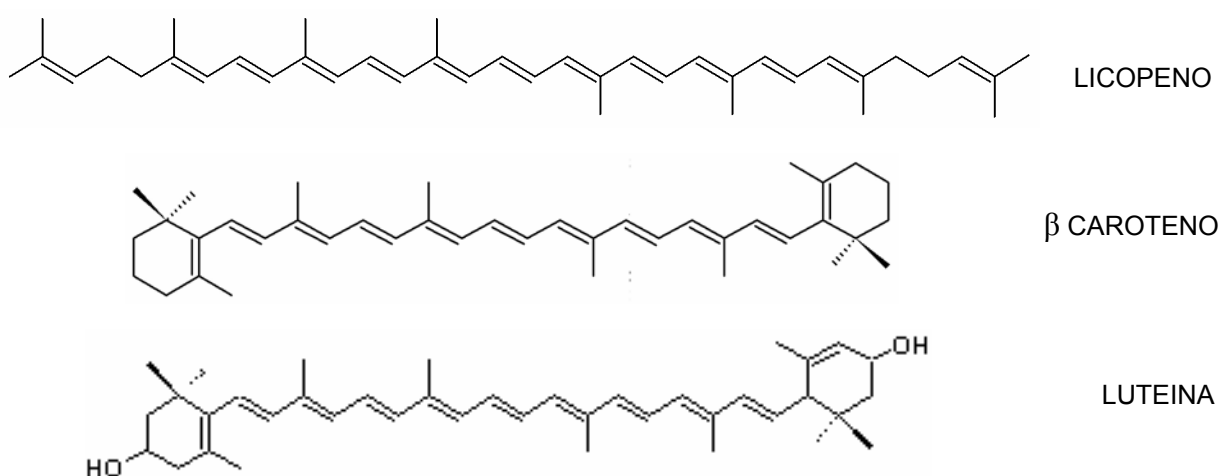
Folhas, raízes e sementes de plantas são fontes naturais de carotenóides, que fornecem a cor e auxiliam na flavorização de produtos alimentícios (GALINDO-CUSPINERA, 2002). Também podem estar presentes em bactérias, fungos, algas, e

até mesmo em animais. Nestes, o tecido adiposo e o leite devem sua cor ligeiramente amarelada a estes pigmentos carotenóides, embora sua proveniência seja vegetal (COSTA, 1975).

Segundo ROBBERS, SPEEDIE e TYLER (1997), os carotenóides são tetraterpenóides com 40 átomos de carbonos, que se caracterizam por apresentarem muitas cores, partindo do amarelo, passando por laranja, vermelho, até púrpura.

O elemento fundamental da estrutura dos carotenóides é uma grande cadeia de oito unidades de isopreno, que pode permanecer linear (como por exemplo na estrutura do licopeno) ou então ciclicizar-se em uma ou ambas as extremidades (β caroteno). Geralmente são hidrocarbonetos, mas por oxidação podem originar as xantofilas, como, por exemplo, a luteína (BRUNETON, 1991). As estruturas destes carotenóides está ilustrada na figura 12.

FIGURA 12 –ESTRUTURAS QUÍMICAS DO LICOPENO, β CAROTENO E LUTEINA



A cadeia carbônica com duplas ligações alternadas fornece um grupo cromóforo, que confere a cor dessas estruturas (ROOBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). A insaturação molecular explica a existência de isômeros *cis* e *trans*, embora nos compostos de origem natural a tendência é o aparecimento da forma *trans* (COSTA, 1975).

Os mais importantes hidrocarbonetos são os α , β e γ carotenos, que são precursores da vitamina A. O mais comum nas plantas superiores e de maior

interesse é o β caroteno, por possuir dois núcleos β -ionona ligados por uma cadeia poliênica, e que por hidrólise fornece duas moléculas de vitamina A, enquanto que os outros carotenos originam somente uma molécula (COSTA, 1975).

Existem também outros carotenóides com menos de 40 átomos de carbono, que é o caso da bixina, uma estrutura oxigenada com 24 carbonos na cadeia central (COSTA, 1975). Os carotenóides estão amplamente distribuídos pela natureza, sendo que nas plantas e microorganismos atuam como agentes fotoprotetores, como pigmentos fotossintéticos, além de agirem sobre a estabilidade das membranas (ROBBERS, SPEEDIE; TYLER, 1997). HAILA, LIEVONEN e HEINONEN (1996), também atribuem aos carotenóides o poder de evitar a oxidação dos óleos nas estruturas vegetais, embora existam algumas contradições em relação a certos carotenóides estudados. Nos animais fornecem a vitamina A e outros retinóides, além de prevenirem doenças como o câncer, provavelmente em função da propriedade antioxidante e de retardo da lesão oxidativa celular (ROBBERS, SPEEDIE; TYLER, 1997). O interesse farmacêutico nesses compostos está principalmente na utilização como corantes naturais, uma vez que não são tóxicos (BRUNETON, 1991).

Em relação ao poder antioxidante, HAILA, LIEVONEN e HEINONEN (1996) fizeram uma comparação dessa atividade entre a luteína, licopeno, bixina e γ -tocoferol na autooxidação de triglicerídeos. Por meio de uma análise da perda de coloração alaranjada dos carotenóides, concluiu-se que a luteína e o licopeno são pró-oxidantes, enquanto que a bixina e γ -tocoferol inibem efetivamente a formação de peróxidos resultantes de um processo oxidativo. Porém, a combinação do γ tocoferol com os carotenóides inibe o efeito pró-oxidante destes e também retarda a perda de coloração alaranjada. Além do mais, a combinação da luteína com o γ -tocoferol é mais eficiente na ação antioxidante quando comparada ao γ -tocoferol sozinho. Com esse estudo, sugere-se que o efeito pró-oxidante dos carotenóides (e conseqüente perda da coloração característica) deve ser considerado quando são utilizados como corantes em produtos alimentícios.

Outro estudo analisa o efeito antioxidante do β caroteno, da bixina e da norbixina em uma emulsão óleo em água e em óleo de oliva. A norbixina foi o único carotenóide que inibiu a deterioração oxidativa em ambos os sistemas lipídicos, possuindo ação semelhante ao γ -tocoferol (KIOKIAS; GORDON, 2003).

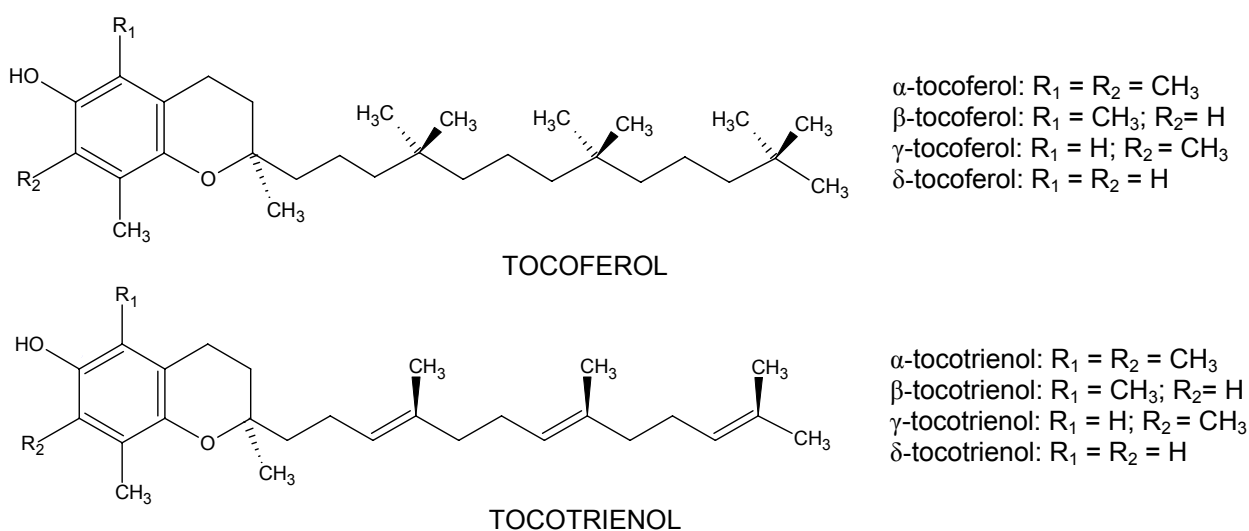
3.2.3 Tocoferóis e Tocotrienóis

Os tocoferóis e tocotrienóis são conhecidos pelo poder de inibição dos processos de oxidação de lipídios em alimentos e sistemas biológicos (VASCONCELLOS, 2005).

Os tocoferóis estão presentes em óleo vegetais e nas partes verdes das plantas, enquanto que os tocotrienóis podem ser encontrados nas sementes e cereais, como trigo, milho e arroz, e também em frutos oleaginosos como côco e algumas espécies de palmeiras.

As denominações α , β , γ e δ dependerão dos radicais ligados à estrutura base dos tocoferóis e tocotrienóis, conforme mostra a figura 13 (VASCONCELOS, 2005).

FIGURA 13 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS



FONTE: VASCONCELOS, 2005

De acordo com FREGA, MOZZON e BOCCI (1998), é raro encontrar δ tocotrienol na natureza, estando presente em poucas espécies, dentre elas *Amaranthus* sp, o farelo de arroz, a cevada, nas sementes de espécies da família Apiaceae e do urucum.

Esses compostos são importantes não somente para os sistemas biológicos e alimentos, mas também para impedir a auto-oxidação do óleo nas sementes

vegetais. Enquanto existem muitos estudos *in vitro* e *in vivo* comprovando a atividade antioxidante dos tocoferóis, os estudos com os tocotrienóis são escassos, provavelmente em razão da dificuldade de encontrá-los (FREGA; MOZZON; BOCCI, 1998). A ação antioxidante desses dois compostos se deve principalmente a sua capacidade em doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres, e com isso impedir a oxidação dos lipídeos (VASCONCELLOS, 2005).

Muita importância tem se dado aos tocotrienóis por possuírem atividades biológicas importantes. Há estudos que sugerem a inibição do crescimento de células cancerígenas em glândulas mamárias e redução do risco de doenças cardíacas por essas moléculas, que podem também prevenir outras patologias que se originam de estresse oxidativo (VASCONCELLOS, 2005; FREGA; MOZZON; BOCCI, 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Os frutos de *Bixa orellana* L. foram coletados no Instituto Ambiental do Paraná (IAP), no município de Morretes, nos meses de junho e julho de 2005.

A identificação foi realizada pelo botânico Gert Hatschbach, do Museu Botânico Municipal da Prefeitura de Curitiba, e uma exsicata da planta encontra-se depositada nesse local sob o número 305810.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

4.2.1 Fragmentação das Sementes

As sementes foram removidas manualmente dos frutos, e colocadas para secar em estufa a 40 °C.

Posteriormente o material foi moído através de um moinho de martelo, a fim de aumentar a superfície de contato com o solvente no momento da extração (SONAGLIO et al, 1999).

4.2.2 Extração em Soxhlet

O processo de extração em Soxhlet requer o emprego de um cartucho de papel ao qual é adicionado o material vegetal. O cartucho é colocado no interior do aparelho e, em seguida, acrescenta-se o solvente, que cobre o material e é recebido em um balão anexado ao Soxhlet. Todo o sistema é conectado a um condensador de bolas e assim inicia-se o processo de aquecimento para extração contínua, quando o solvente condensa e percola pelo cartucho, para então refluxar novamente. Nesse trabalho, foi feita uma modificação no processo, pois não se utilizou o cartucho em razão da grande quantidade de sementes, e para melhorar a difusão e contato do solvente com o material.

Para a extração utilizou-se um gradiente de polaridade crescente, constituído respectivamente por hexano, clorofórmio e acetato de etila. O tempo de cada extração foi de seis horas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 1999).

Após a primeira extração com hexano, todo o equipamento foi limpo e seco, e o marco residual foi novamente colocado em Soxhlet, sendo realizadas mais duas extrações, com clorofórmio e acetato de etila, nas mesmas condições experimentais.

Em seguida, o líquido extraído foi filtrado para remoção de qualquer impureza e então concentrado em rotoevaporador para eliminação do solvente.

Os rendimentos foram obtidos considerando-se o peso inicial das sementes secas e moídas. O armazenamento foi feito em frascos de vidro âmbar, cobertos com papel alumínio e em refrigeração para evitar oxidação e/ou rancificação.

A fração hexânica foi denominada de óleo, por ser assim constituída, enquanto que os demais extratos foram tratados como fração clorofórmica e acetato de etila.

4.2.3 Identificação do Cristal

Durante a extração clorofórmica obteve-se cristais de coloração vermelho-púrpura.

O ponto de fusão desses cristais foi realizado adicionando uma fração desse material a um capilar de vidro, que foi devidamente acondicionado em um aparelho de aquecimento automático, juntamente com um termômetro. A temperatura foi marcada quando a substância começou a fundir.

Também foi realizada uma análise em espectroscopia de infravermelho (IV), em equipamento modelo Excalibur, Series FTS 3500GX e programa para leitura Bio-Rad Merlin. A varredura foi feita de 400 a 4000 cm^{-1} , leitura de transmitância e detector DTGS. A amostra foi pastilhada com brometo de potássio (KBr).

A ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1 (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C) foi executada na Universidade Estadual de Maringá (UEM), em equipamento Espectrofotomer RMN – Varian, modelo Gemini. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram realizados a 300MHz e 75MHz, respectivamente, com dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente e padrão interno de referência.

4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.3.1 Reologia

O comportamento reológico do óleo foi determinado em equipamento Brookfield, modelo RVDV III – plus (+), com cone coaxial (spindle) SC 4-21, a uma temperatura de 26°C.

4.3.2 Solubilidade

A solubilidade do óleo foi determinada em etanol a 90%. Para isso, em um tubo de ensaio contendo 0,1 mL de óleo foram adicionadas frações de 0,1 mL de etanol. Após cada adição, agitava-se o tubo para verificar se o material havia sido solubilizado. Esse ensaio visa determinar em quantas partes de etanol a 90% o óleo em estudo é solúvel.

4.3.3 Densidade

A densidade foi medida coletando-se 5,9µL de óleo com uma pipeta volumétrica, e essa quantidade pesada em uma balança eletrônica. A relação da massa pelo volume forneceu a densidade absoluta.

4.3.4 Espalhabilidade

Esse teste baseia-se na resistência ao movimento forçado.

Uma placa molde circular de vidro, com diâmetro de 20 cm e 0,2 mm de espessura, e com um orifício central de 1,2 cm de diâmetro, foi colocada sobre uma placa de vidro de 20 X 20 cm. Sob essas placas posicionou-se uma folha de papel milimetrado e a amostra foi introduzida no orifício da placa molde, nivelando-se com uma espátula. A placa molde foi cuidadosamente retirada e sobre a amostra foi colocada uma placa de acrílico de peso 205,8 g. Após um minuto calculou-se a superfície abrangida pelo óleo através da medição do diâmetro em duas posições opostas, para posterior cálculo do diâmetro médio (ZANIN et al., 2001).

A espalhabilidade, determinada a 25 °C, foi calculada pela equação representada no quadro 2.

QUADRO 2 – EQUAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE

$$Ei = \frac{d^2 \times \pi}{4}$$

Sendo Ei a espalhabilidade da amostra para o peso i , em mm^2 , e d é o diâmetro médio, em milímetros.

4.3.5 Análise em Espectroscopia de Ultravioleta

O óleo foi submetido à espectroscopia de absorção no ultravioleta (UV), a fim de verificar o comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) absorvido e também calcular o fator de proteção solar (FPS) pelo método espectrofotométrico, descrito por MANSUR et al. (1986) e representado pela equação no quadro 3.

QUADRO 3 – EQUAÇÃO PARA CÁLCULO DE FPS PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

$$\text{FPS espectrofotométrico} = \text{FC} \cdot \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot \text{abs}(\lambda)$$

FC = fator de correção (=10)

EE (λ) = efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (λ)

I (λ) = intensidade do sol no comprimento de onda (λ)

abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução do filtro solar no comprimento de onda (λ)

As constantes EE e I são pré-definidas por MANSUR et al (1986).

A análise foi realizada em Espectrofotômetro de UV da marca Shimadzu, modelo UV-1601 PC. A concentração do óleo foi de 0,2 $\mu\text{L/mL}$ de metanol e a análise realizada em triplicata.

4.3.6 Análise em Espectroscopia de Infravermelho

O equipamento utilizado para essa análise foi do modelo Excalibur, Series FTS 3500GX, e programa para leitura Bio-Rad Merlin. A varredura foi feita de 400 a 4000cm⁻¹, leitura de transmitância e detector DTGS. As amostras foram pastilhadas com brometo de potássio (KBr).

4.4 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Para determinação dos ácidos graxos, o óleo em estudo foi esterificado com anidrido acético. A análise foi determinada por CG-EM da marca Varian, modelo Saturno 2000R, em coluna capilar OV-225, com as seguintes condições de análise foram: temperatura inicial de 50 °C, com elevação do aquecimento de 40 °C por minuto, até 220 °C, que foi mantido durante 30 minutos; temperatura do injetor de 250 °C.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana do óleo foi realizada no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), pelo método de difusão em ágar e concentração mínima inibitória (CMI), de acordo com KONEMAN et al. (1993). Os microorganismos utilizados foram *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus pyogenes* (ATCC 19615).

Os ensaios foram realizados em condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Para isso, todo material utilizado, como pipetas, placas de Petri e tubos de ensaio, foram autoclavados a 120 °C por 15 minutos. Também foram utilizadas suspensões padronizadas das amostras a serem testadas, tendo o cloranfenicol e cefalotina como controle positivo e o etanol, diluente das amostras, como controle negativo. Os discos de papel, inclusive com os antibióticos, foram adquiridos da empresa Newprov.

Para o ensaio de difusão em ágar, caso a amostra apresente ação inibitória sobre os patógenos, um halo de não-crescimento ao redor do disco será formado, havendo no restante do meio o crescimento das colônias. Para o segundo método, a concentração mínima inibitória será aquela correspondente ao primeiro tubo da série com as amostras que não apresentar crescimento, caracterizado pela não turvação do meio (considerando que o primeiro tubo terá a menor, e o último tubo terá a maior concentração de amostra).

O ensaio de CMI é mais adequado para a amostra em questão, que se caracteriza por ser lipofílica. Porém, uma adaptação ao método de difusão em ágar foi realizada a fim de facilitar a difusão da amostra para o meio hidrofílico. Para isso, utilizou-se o surfactante monoleato de sorbitano 20 OE (óxido de etileno), Tween[®] 80, para diluir a amostra juntamente com o etanol.

As séries foram realizadas em triplicata para cada microorganismo.

4.5.1 Método de Difusão em Ágar

4.5.1.1 Preparo da amostra

O óleo foi diluído em etanol e Tween[®] 80 (4:1) nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg. Para isso, preparou-se uma solução base de 250mg / 5ml, e diluições subseqüentes foram feitas para obtenção das quatro concentrações avaliadas.

4.5.1.2 Preparo dos discos de papel

Os discos de papel estéreis foram identificados, colocados em uma placa de Petri esteril, e impregnados com as diluições pré-determinadas com o auxílio de uma micropipeta. Posteriormente, foram deixados em estufa a 35 °C por 24 horas para total secagem do solvente. Discos com etanol e com Tween[®] 80 foram utilizados como controle negativo. Os discos de cloranfenicol e cefalotina apresentavam 30µg dessas substâncias.

4.5.1.3 Preparo dos meios de cultura

O meio utilizado para esse experimento é o ágar Muller-Hinton, que após o preparo, foi autoclavado a 120 °C por 15 minutos e deixado resfriar até 50 °C. Nessa temperatura e em fluxo laminar, 60 mL do meio foram distribuídos em cada placa de Petri estéril, e deixados em repouso para solidificação. Posteriormente essas placas foram fechadas e reservadas.

4.5.1.4 Preparo do inóculo

As cepas utilizadas para o estudo foram repicadas em tubos de ensaio com ágar Muller-Hinton 24 horas antes do teste.

Com o auxílio de uma alça e em câmara de fluxo laminar, as colônias de cada bactéria foram diluídas em tubos de ensaio contendo solução salina estéril.

O parâmetro de turbidez foi comparado ao tubo 5 da escala de Mac Farland, preparado segundo BIER (1980). Utilizando um espectrofotômetro de UV da marca Shimadzu, modelo UV-1601 PC, em 650 nm, a concentração microbiana foi ajustada de forma que as absorbâncias das suspensões bacterianas apresentassem o mesmo valor do tubo 5, o que corresponde a $1,5 \cdot 10^9$ UFC/mL.

4.5.1.5 Preparo do teste

Para cada placa com o microorganismo, foram distribuídos seis discos de papel, sendo quatro deles embebidos com as diluições do óleo nas concentrações de 1000 µg, 500 µg, 250 µg e 125 µg, um impregnado com etanol para controle negativo e o outro com cloranfenicol, para controle positivo. Separadamente em outra placa, foram colocados um disco com Tween[®] 80 e outro com a cefalotina, a fim de evitar a proximidade deles com os demais discos, dificultando a visualização dos halos.

Esse mesmo procedimento foi feito para cada bactéria testada, e realizados em triplicata, tanto para as placas com a amostra quanto para as placas de controle positivo/negativo.

Uma placa contendo somente o meio de cultura, sem nenhuma bactéria inoculada, foi utilizada como controle de esterilidade, na qual foi colocada um disco de cada diluição e de cada controle.

As placas foram incubadas em estufa a 35°C e as leituras dos halos de inibição foram feitas após 24 horas e 48 horas (KONEMAN et al, 1993).

4.5.2 Método da Concentração Mínima Inibitória

4.5.2.1 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, utilizou-se as mesmas suspensões microbianas em meio salino com $1,5 \cdot 10^9$ UFC/mL, obtidas do ensaio de difusão em ágar. Destas, transferiu-se 0,2 mL de cada para um frasco previamente autoclavado com 100mL de Tween[®] 80 e então desses frascos foi retirado 1 mL para colocar nos tubos de ensaio controle e com as amostras.

4.5.2.2 Preparo do teste

Por esse método obteve-se uma série de oito tubos de ensaio contendo meio de cultura, aos quais foram adicionadas quantidades de 1000 µg, 500 µg, 250 µg, 125 µg, 62,5 µg e 31,25 µg do óleo. O primeiro tubo não continha a amostra e serviu como controle positivo de crescimento, enquanto que o último representava o controle negativo, ou seja, somente com a amostra.

O meio de cultura utilizado foi o Caldo Casoy, previamente autoclavado a 120°C por 15 minutos e deixado resfriar totalmente antes de começar o experimento. Dentro do fluxo laminar foram colocadas as amostras nas concentrações pré-determinadas dentro dos meios e por fim inoculadas as suspensões de microorganismos. A incubação ocorreu a 35 °C por 18 a 20 horas.

Ao final do período, os tubos foram analisados quanto ao crescimento dos microorganismos, verificando a turvação do meio. A concentração correspondente ao primeiro tubo da série que estivesse límpido, ou seja, sem crescimento, seria considerada a concentração mínima inibitória. Ela representa que, nessa concentração, é capaz de impedir o crescimento do microorganismo analisado.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi determinada por dois métodos. O primeiro baseia-se na formação de um complexo fosfomolibdênico e o outro é caracterizado pela capacidade da amostra em reduzir o radical DPPH. Ambos utilizam leituras espectrofotométricas na região do UV para apresentar os resultados.

4.6.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênico

Esse ensaio baseia-se na técnica descrita por PRIETO, PINEDA e AGUILAR (1999). A reação para formação do complexo requer o preparo de um reativo que consiste de uma solução com fosfato de sódio 0,1M (28 mL), molibdato de amônio 0,03M (12 mL) e ácido sulfúrico 3M (20 mL), sendo o volume completado com água para 100 mL. Esse reativo foi preparado no momento do uso. Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como a amostra de óleo a ser testada, devem estar na concentração de 200 µg/mL em metanol (BIANCO, 2003).

Em um tubo de ensaio, retirou-se uma alíquota de 0,1 mL da amostra, e adicionou-se 1 mL de reativo. O mesmo foi feito para os padrões. Um branco foi constituído de 0,1 mL de metanol e 1 mL de reativo. A análise foi realizada em triplicata, com os tubos hermeticamente fechados. Posteriormente, manteve-se a série de tubos em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente, a leitura das absorbâncias (Abs) foi realizada em espectrofotômetro de UV da marca Shimadzu, modelo UV-1601 PC, em 695 nm. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) do óleo em relação à vitamina C e rutina, conforme as equações do quadro 4.

QUADRO 4 – CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA PELO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNICO

AAR% EM RELAÇÃO À VITAMINA C	$\frac{\text{Abs}_{(\text{amostra})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}}{\text{Abs}_{(\text{vitamina C})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}} \times 100$
AAR% EM RELAÇÃO À RUTINA	$\frac{\text{Abs}_{(\text{amostra})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}}{\text{Abs}_{(\text{rutina})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}} \times 100$

4.6.2 Redução do Radical DPPH

Esse ensaio foi realizado de forma qualitativa e quantitativa.

A técnica qualitativa descrita por CONFORTI et al. (2002), CAVIN et al. (1998) e ARBOS (2004) baseia-se na análise da amostra por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), seguida da revelação por uma solução de DPPH.

Após selecionar a fase móvel *hexano:acetato de etila:ácido fórmico (85:20:3)* e de promover a migração ascendente da amostra na cromatoplaça de sílica gel SG-60 Merck®, a revelação foi feita com uma solução de DPPH a 0,2% em metanol. A análise foi realizada após 30 minutos sob luz natural a fim de verificar a presença de manchas amarelas contra um fundo púrpura, que indicam a presença de compostos antioxidantes na amostra. Como padrão, optou-se pela aplicação de vitamina C. O óleo foi diluído em metanol na concentração de 10 mg/mL.

A metodologia para o ensaio quantitativo foi adaptada e baseada nas técnicas descritas por MORENO et al. (2000), CHOI et al. (2002), ARBOS (2004), LU e FOO (2001), ADELMANN (2005) e BIANCO (2004).

De acordo com SILVA (1999) e CAVIN et al. (1998), a avaliação da capacidade antioxidante quantitativa terá como base a redução do radical DPPH medida em espectrofotometria de UV visível.

A solução de DPPH foi preparada minutos antes do ensaio a 1mM em etanol absoluto, e armazenada sob refrigeração (BLOIS, 1958). Soluções estoque de óleo (3,0 mL) nas concentrações de 6,25 µg/mL a 75 µg/mL foram adicionadas de 0,1 mL da solução de DPPH e deixadas reagir em repouso por 30 minutos na temperatura ambiente e na ausência total da luz. As mesmas soluções amostra (3,0 mL) sem reagir com DPPH constituíram o branco da reação.

A vitamina C foi preparada em etanol nas concentrações 6,25 µM, 12,5 µM e 25 µM, e a rutina a 3,125 µM, 6,25 µM e 12,5 µM.

Após os 30 minutos, mediu-se a Abs das soluções em 517 nm. Todas as etapas foram feitas em triplicata. A porcentagem da atividade antioxidante (AA%) foi medida através da fórmula no quadro 5.

QUADRO 5 – CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH

$$AA\% = 100 - \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs controle positivo}}$$

Para o controle positivo foi medida a absorbância da solução de DPPH.

Os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (IC_{50}) foram calculados no gráfico onde a abcissa representa a concentração da amostra de óleo e a ordenada é a média da AA% das 3 amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, do tipo $y = ax + b$, serviu de base para determinação do valor de IC_{50} .

4.6.3 Pesquisa de Tocotrienol e Tocoferol

Realizou-se uma CCD do óleo e de um padrão de tocotrienol e tocoferol, o composto Tocotrimax^{®8} para pesquisar essas substâncias na amostra. As condições experimentais foram as mesmas do item 4.6.2.

Para confirmar a presença de tocotrienol e tocoferol no óleo, foi realizada uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em equipamento Merck Elite Lachrom, detectores DAD L2450 Elite LaChrom, coluna C18 Merck ODS 5 μ m (250 mm X 4 mm d.i.) de fase reversa, à temperatura de 25°C e sistema de separação isocrático. A fase móvel era composta de 90% de acetonitrila e 10% de fase ácida (ácido sulfúrico 0,05M e ácido fosfórico a 1%). O fluxo foi de 2 mL/min e a faixa espectral de 200 a 500 nm.

4.6.4 Isolamento e Identificação do Composto Antioxidante “X”

Na tentativa de isolar e identificar o composto antioxidante “X”, indicado na figura 28, uma cromatografia em coluna, seguida de uma preparativa foi realizada.

Aproximadamente 11mL do óleo foram incorporados em 20 g de Sílica Gel SG-60 Merck[®] para formação da pastilha de sílica. Essa mistura foi levada a banho-maria para total secura até obter um pó fino e seco. Posteriormente, a pastilha foi depositada no topo da coluna (30 X 3cm) empacotada com 30 g de Sílica Gel SG-60 Merck[®] e eluída com sistema de solventes na forma de gradiente de polaridade crescente, sendo utilizado hexano, acetato de etila e metanol.

⁸ Matéria-prima obtida da Galena Química e Farmacêutica Ltda.

Algumas frações obtidas da coluna que apresentaram perfil semelhante por CCD, foram submetidas a cromatografia preparativa em Sílica Gel SG-60 Merck® de 20 X 7 cm. Para isso, dissolveu-se 10 mg de amostra em 1mL de clorofórmio, que foi aplicado por toda a extensão da placa. A fase móvel utilizada foi a mesma do item 4.6.2.

A revelação foi feita com a solução de DPPH 0,2% somente em uma pequena faixa de uma das extremidades da placa, permitindo a visualização da região onde se encontrava a substância antioxidante.

A identificação do composto isolado foi realizada por RMN ^1H e ^{13}C . As análises foram executadas na Universidade Estadual de Maringá (UEM), em equipamento Espectrofotomer RMN – Varian, modelo Gemini. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram realizados a 300MHz e 75MHz, respectivamente, com clorofórmio deuterado (CDCl_3). O padrão de referência de escala para a RMN ^1H foi o TMS, enquanto que para a RMN ^{13}C , teve-se como base os deslocamentos químicos do CDCl_3 .

4.7 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO COSMÉTICA

Optou-se pelo desenvolvimento de um gloss labial, e como veículo principal foi selecionado o Versagel ME 750®, obtido a partir do poliisobuteno hidrogenado, sendo composto também de copolímeros de etileno, propileno, butileno e estireno.

Foram realizados ensaios reológicos, de espalhabilidade e pH. Microfotografias foram feitas para análise da homogeneidade, em razão do tamanho e formato das gotículas, posto que não se conduzirão testes de estabilidade.

A reologia foi realizada em Viscosímetro Rotativo da marca Rheotest, tipo RV, com spindle S2. A temperatura de análise foi de 25°C.

A espalhabilidade foi medida da mesma forma executada com o óleo puro e o pH determinado com fitas medidoras da Merck®.

As microfotografias foram realizadas em um microscópio óptico biocular fotônico da marca Olympus bx 40, câmera Sony e sistema de imagem proplus 3.0.

5 RESULTADOS

5.1 FRAGMENTAÇÃO DAS SEMENTES

O teor de umidade encontrado (média de três amostras) foi de 12,42% e o tamanho das partículas apresentou-se em torno de 0,5 a 2,0 mm.

5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Muitos métodos para obtenção de extratos vegetais podem ser empregados, mas a escolha dependerá de alguns fatores como o tipo e volume de solvente a ser utilizado, a quantidade de droga disponível, a temperatura do processo de extração, bem como a duração desse processo. Um dos métodos mais utilizados e eficientes é a extração com solventes orgânicos em equipamento Soxhlet, que consiste no emprego de um volume não muito grande de solvente, que fica continuamente em contato com o material vegetal, sob aquecimento, e, portanto, promove uma maior interação entre sólido-líquido (PAIVA et al., 2004).

Partiu-se de 836,70g de material. O rendimento da extração do óleo por essa técnica foi de 5,04%, em um período de 6 horas.

MATOS et al (1992) realizaram a extração de óleo fixo de algumas oleaginosas, dentre elas *B. orellana*, nas mesmas condições experimentais, porém por um período de 2 horas. O rendimento foi de 2,30%, que parece ser um resultado coerente com o encontrado, uma vez que o período de extração nesse trabalho foi superior.

Na fração clorofórmica, ainda no momento da extração, já se detectava a presença de cristais no fundo do balão. Após o término do processo, essa fração foi filtrada em funil de Buchner, recolhendo-se cerca de 30 g de cristais, que correspondem a 3,6% de rendimento, e que se apresentaram brilhantes e de cor vermelho-púrpura. Esses cristais foram lavados com clorofórmio gelado para remoção de impurezas, secos, armazenados em um frasco âmbar e conservados sob refrigeração.

De acordo com SILVA (2000) e BARBOSA FILHO et al. (1998), esses cristais correspondem à bixina, principal constituinte do corante.

Um fator que pôde ser visto durante as extrações foi a descoloração das sementes durante o processo. Após a extração com hexano, as sementes ainda permaneciam bastante vermelhas, e a fração hexânica apresentava coloração vermelho-alaranjada. Já a fração clorofórmica era de cor vermelho intensa e as sementes após a extração estavam praticamente desprovidas de cor. A fração acetato de etila apresentava uma forte cor amarela. Isso demonstra que o corante vermelho característico do urucum saiu em maior proporção com o clorofórmio do que com o hexano e acetato de etila.

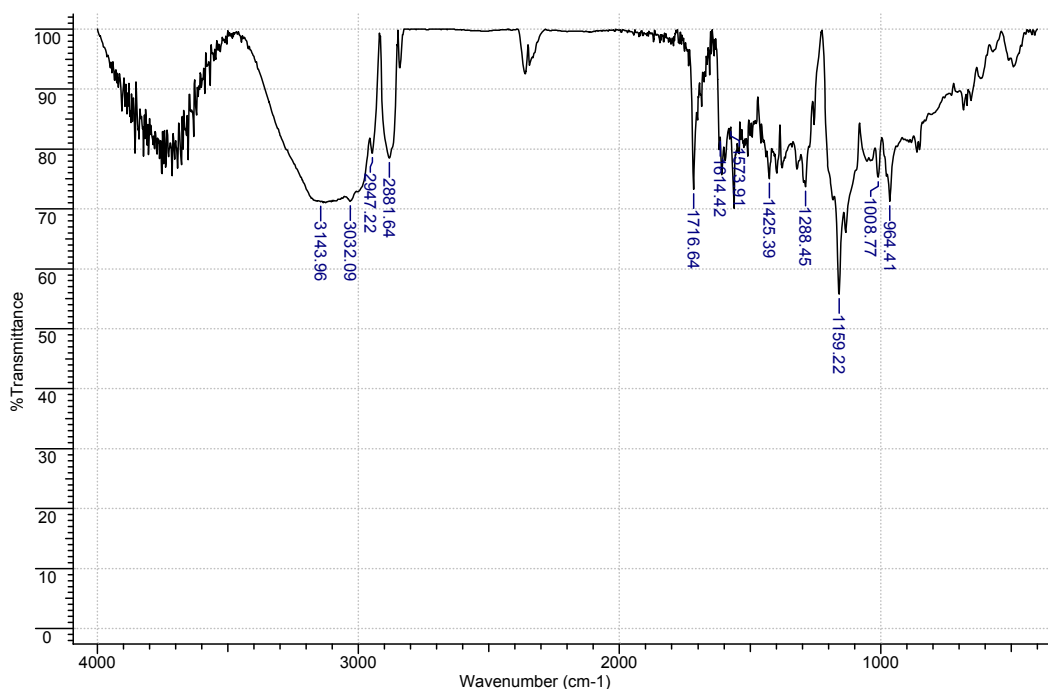
A fração acetato de etila foi a que obteve menor rendimento e não foi utilizada para o trabalho, assim como a fração clorofórmica. A maior ênfase, portanto, foi dada para o óleo, caracterizado por meio de várias análises.

5.2.1 Identificação do Cristal

Os cristais obtidos da fração clorofórmica apresentaram ponto de fusão de 195 °C, que corresponde ao valor encontrado por SILVA (2000) para a bixina.

O espectro de IV, apresentado na figura 14, mostrou uma banda do grupamento hidroxila em 3143,96 cm⁻¹, as metilas e metilenos alifáticos em 2947,22 e 2881,64 cm⁻¹, e a carbonila em 1716,64 cm⁻¹. Esses grupamentos também estão presentes na estrutura química do corante bixina.

FIGURA 14 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE IV DO CRISTAL EM KBr



O espectro de RMN de ^1H para a amostra analisada, representado na figura 15, apresentou sinais de deslocamento químico entre 1,91 -1,96 ppm que correspondem a próton das metilas ligadas aos carbonos vinílicos, um singlete em 3,68 ppm que corresponde a metoxila do grupamento éster e também dois pares de dubletos em 5,79 / 7,23 e 5,90 / 7,85 ppm atribuídos respectivamente a H_α / H_β aos grupos carboxílicos do ácido livre e do éster. Também apresentou multipletos entre 6,41 a 6,90 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C mostrado na figura 16 apresentou sinais de deslocamento químico em 167,7 e 166,9 ppm referentes aos carbonos das carbonilas de ácido e éster, respectivamente. Também apresentou sinal de deslocamento em 51,4 ppm referente ao carbono da metoxila do éster. Na região de 120 a 148,2 ppm observou-se multiplicidade de sinais correspondentes aos carbonos sp_2 da cadeia vinílica e na região entre 12 -20 ppm os sinais de deslocamento de carbonos das metilas ligadas aos carbonos vinílicos (figura 17).

No mapa de correlação bidimensional de sinais de deslocamento de ^1H - ^1H (COSY) observou-se a correlação dos dubletos em 5,79 / 7,23 e 5,90 / 7,85, conforme mostra a figura 18.

No mapa de correlação bidimensional ^1H - ^{13}C (HMQC), visto na figura 19, observou-se a correlação dos sinais de H em 1,91 -1,96 ppm e C das metilas, a correlação do sinal de H em 3,68 ppm e C em 51,4 ppm referente a carbono da metoxila do éster. Também se pôde visualizar a correlação dos dubletos de H em 5,79 e 5,90 ppm com os C em 117,2 e 117,6 ppm e os dubletos de H em 7,23 e 7,85 ppm com C em 148,2 e 139,9 ppm, respectivamente.

FIGURA 18 – MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL ^1H - ^1H (COSY) DO CRISTAL (300MHz, DMSO)

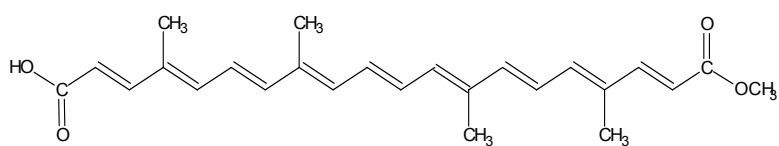
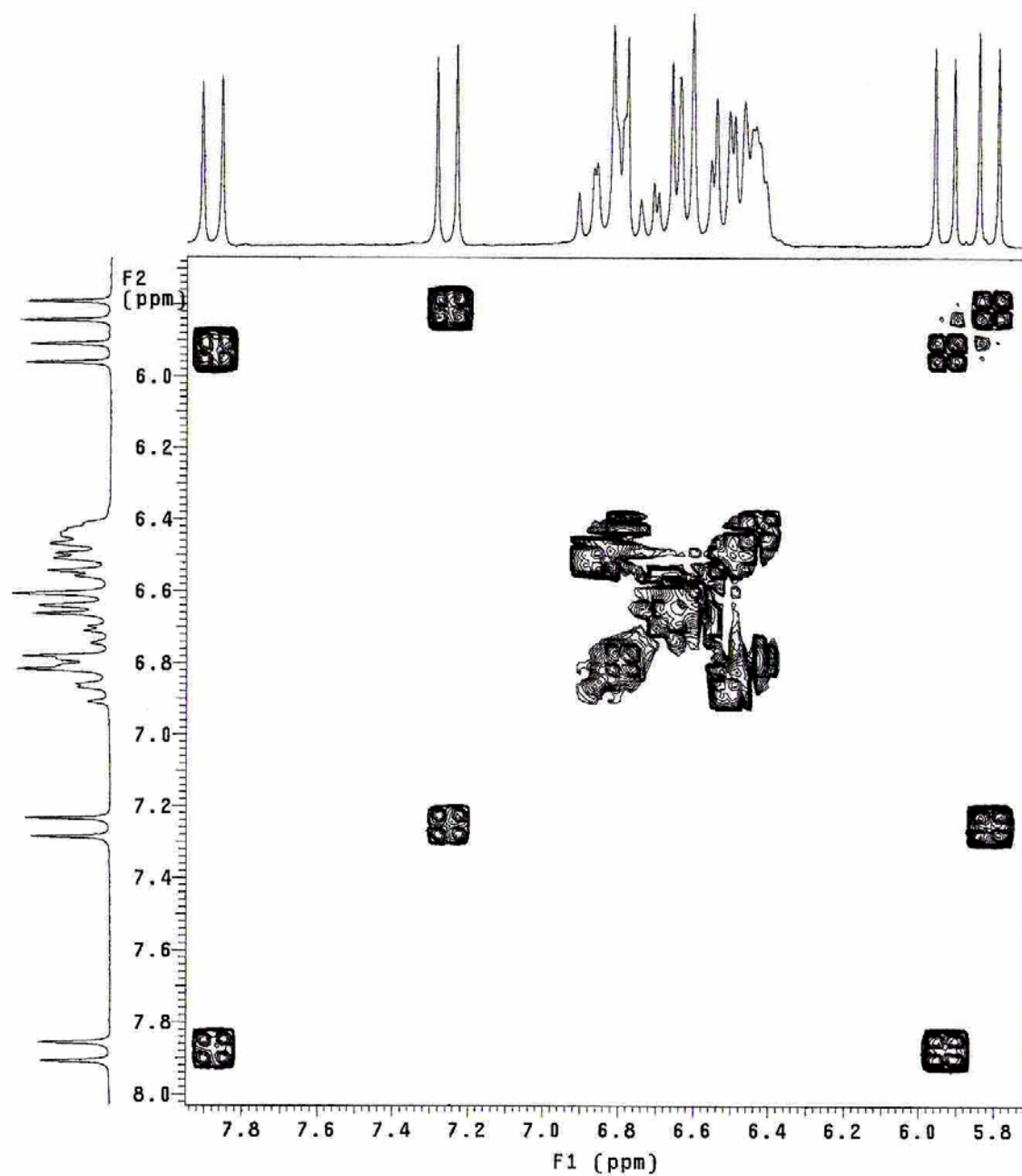
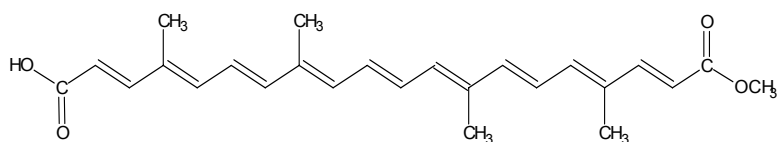
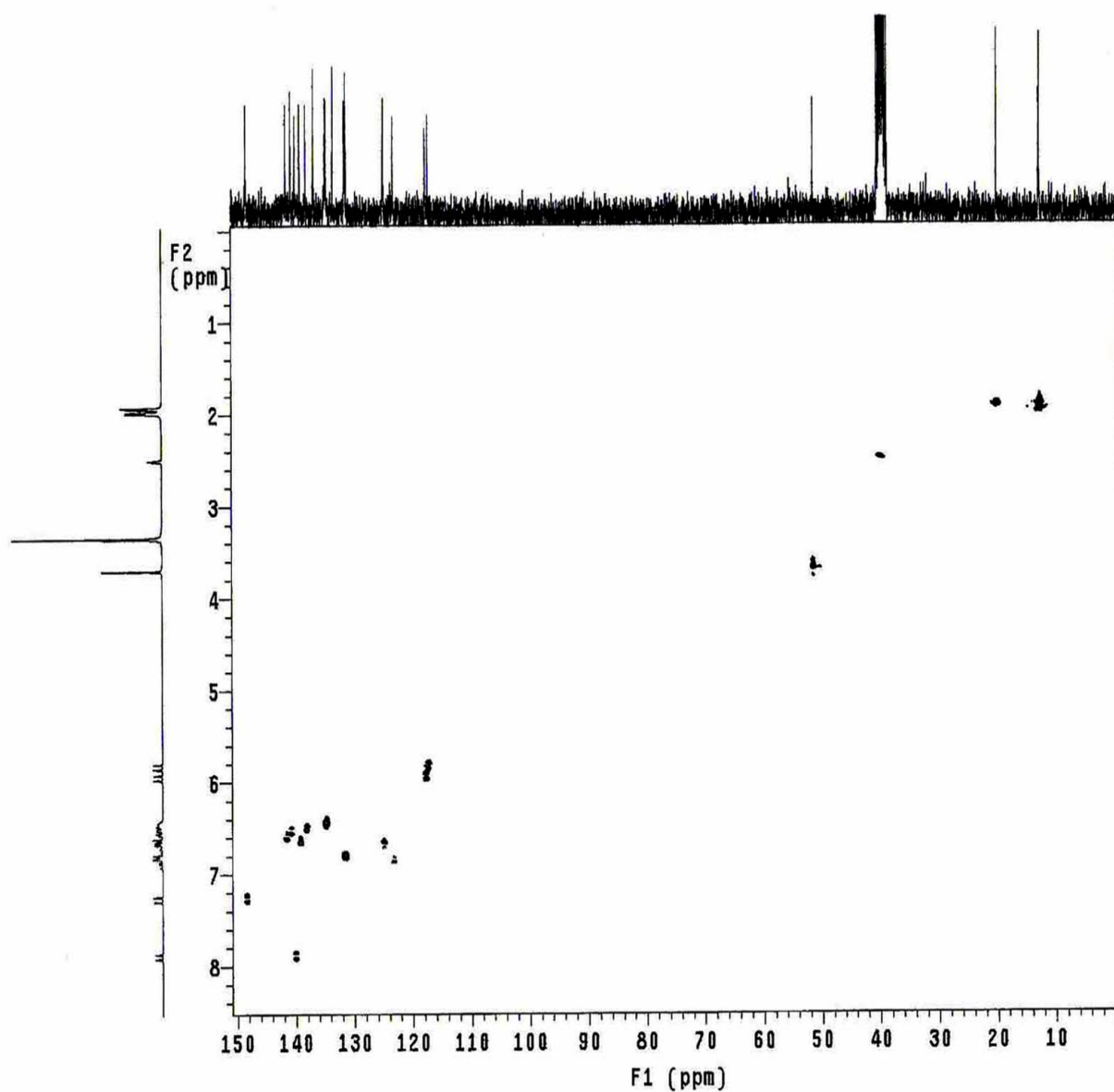


FIGURA 19 – MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL ^1H - ^{13}C (HMQC) DO CRISTAL (DMSO)



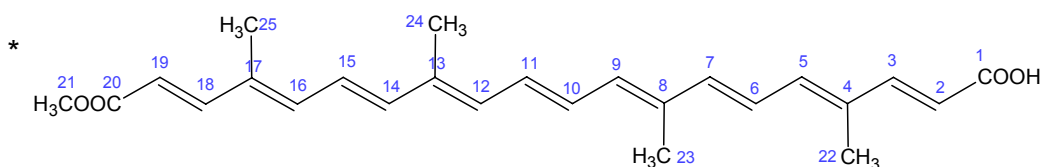
Dessa forma, a análise dos dados de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, DEPT e HMQC e dados de literatura (COSTA; CHAVES, 2005; OLIVEIRA, 2005) permitiram caracterizar o cristal obtido como sendo o corante bixina*, conforme tabela 3.

TABELA 3 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E DE ^{13}C DO CRISTAL E CORRELAÇÃO HMQC.

CARBONO*	$^{13}\text{C}^a$	$^{13}\text{C}^b$	HMQC ^b $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$
1	167,9	167,8	
2	117,3	117,2	5,79
3	131,2	131,2	
4	148,2	148,2	7,23
5	131,4	131,4	
6	140,6	140,6	
7	138,0	138,0	
8	139,0	139,1	
9	134,6	134,5	
10	133,4	133,4	
11	131,3	131,3	
12	134,7	134,7	
13	-	136,7	
14	136,7	136,7	
15	123,1	123,1	
16	124,8	124,8	
17	140,0	139,9	7,85
18	141,5	141,4	
19	117,7	117,6	5,90
20	166,9	166,9	
21	51,4	51,4	3,68
22	19,9	19,9	1,91 – 1,96
23	13,9	12,6	1,91 – 1,96
24	12,7	12,5	1,91 – 1,96
25	12,6	12,4	1,91 – 1,96

^a OLIVEIRA J.S. Purificação de compostos de urucum por processo adsorptivo, Florianópolis, 2005, 185f. Tese (Doutorado em Eng^a Química), UFSC.

^b Medidas feitas observando-se o núcleo de ^1H a 300 MHz e ^{13}C a 75 MHz, DMSO, ppm.



5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

5.3.1 Reologia

Os dados reológicos são muito importantes industrialmente porque permitem determinar a funcionalidade dos componentes para o desenvolvimento de produtos, fazer o controle de qualidade do produto final e determinar sua vida de prateleira,

definir os equipamentos que serão utilizados na fabricação, escolher a embalagem mais adequada para aquele produto, além de permitir a avaliação da sua textura pela correlação com dados sensoriais. De um batom labial, por exemplo, espera-se que permita a liberação da cor facilmente para os lábios, mas que também mantenha o seu formato original, mesmo em altas temperaturas. Esse comportamento é determinado pelas características reológicas do material (LABA, 1993).

O estudo do fluxo que considera a viscosidade de um material denomina-se reologia, sendo que o comportamento reológico pode ser classificado como newtoniano ou não-newtoniano, dependendo dos tipos de fluxo e deformação da matéria.

Os comportamentos newtonianos ocorrem quando uma força atua sobre a superfície de um corpo ou sistemas líquidos, sólidos ou semi-sólidos, ocasionando a deformação destes. Tal deformação corresponde a um deslocamento do fluxo do sistema. Para esse caso, pode-se aplicar a equação do fluxo de Newton, demonstrada no quadro 6.

QUADRO 6 – EQUAÇÃO DO FLUXO DE NEWTON

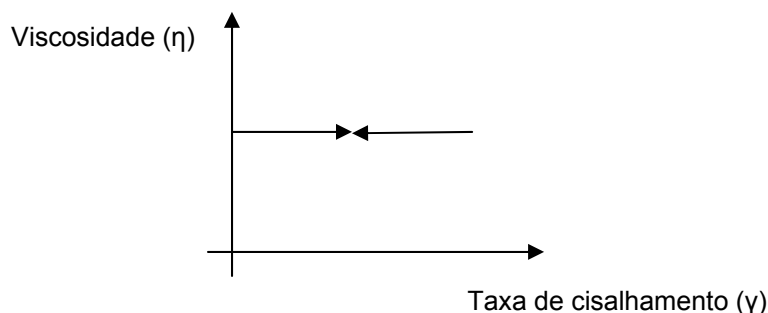
$$T = \eta \gamma$$

Segundo essa lei, a tensão de cisalhamento (T) é diretamente proporcional à velocidade ou taxa de cisalhamento (γ). O coeficiente η é uma variável de resistência do material de escoamento e é designado viscosidade dinâmica, tendo como unidade o Pascal.

Líquidos puros, como a água, apresentam esse comportamento, que pode ser representado pelo gráfico 1 (ALMEIDA e BAHIA, 2002).

A viscosidade em um sistema newtoniano constitui uma constante em uma dada temperatura, independente da taxa de cisalhamento, o que já não acontece nos comportamentos não-newtonianos. Nestes, a viscosidade não é constante e depende, além da temperatura, de outros fatores como o tempo de repouso, a concentração, temperatura e pressão.

GRÁFICO 1 – COMPORTAMENTO NEWTONIANO



Nos sistemas não-newtonianos o comportamento do fluido não é mais descrito pela equação de Newton, mas por um modelo representado pela Lei das Potências apresentada no quadro 7.

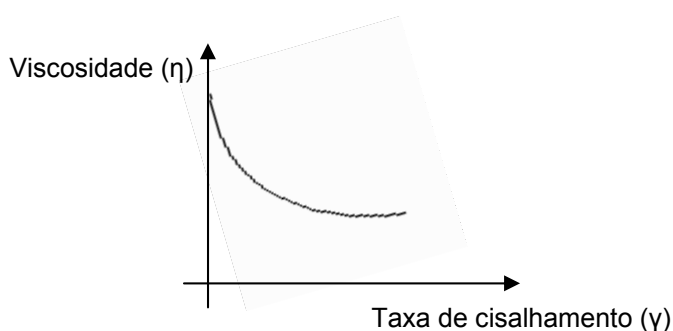
QUADRO 7 – LEI DAS POTÊNCIAS

$$\tau = \kappa \gamma^n$$

Onde κ é o coeficiente de consistência e tem as unidades de viscosidade, n é o índice de escoamento (adimensional) e que caracteriza o desvio em relação ao comportamento newtoniano.

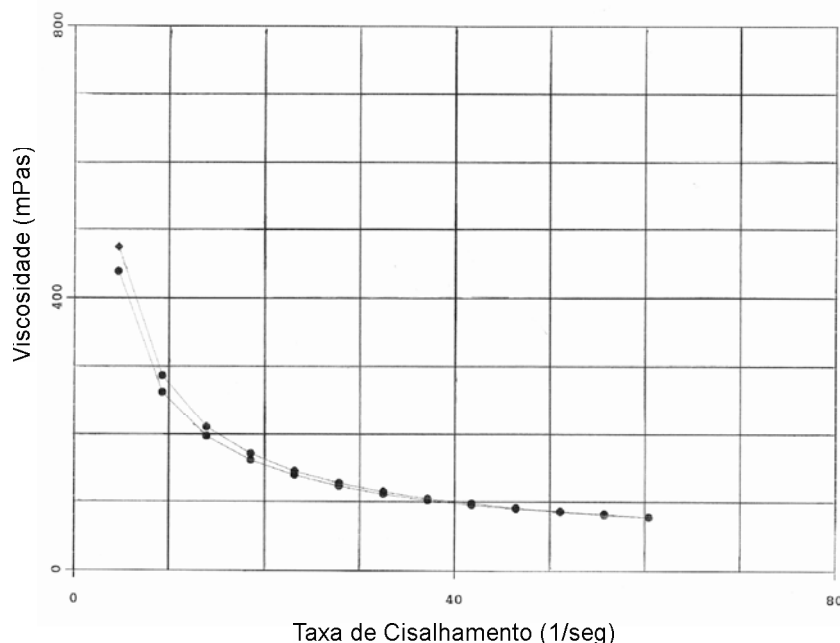
Uma subclassificação do sistema não-newtoniano é o comportamento pseudoplástico. Plotando-se um gráfico do comportamento de um fluido pseudoplástico, não existirá mais uma reta, como no sistema newtoniano, mas sim uma curva, que mostrará que a viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento, conforme o gráfico 2. Esse caso é característico de sistemas coloidais (ALMEIDA e BAHIA, 2002).

GRÁFICO 2 – COMPORTAMENTO NÃO-NEWTONIANO



As considerações feitas acima visam contribuir para o melhor entendimento do comportamento reológico do óleo de *B. orellana*, representado na figura 20.

FIGURA 20 – COMPORTAMENTO REOLÓGICO DO ÓLEO



Como pode ser observado, o óleo em estudo possui diferentes velocidades e uma larga taxa de cisalhamento em diferentes viscosidades, mostrando um comportamento newtoniano e não newtoniano. Observa-se entre 10 e 30 seg^{-1} que a viscosidade diminui progressivamente à medida que a velocidade de cisalhamento aumenta, caracterizando um comportamento pseudoplástico. Esse tipo de material flui sofrendo afinamento por cisalhamento, o que confere a ele especial espalhabilidade.

Essa característica é particularmente importante nesse trabalho, pois à medida que existe uma tensão sobre uma formulação contendo esse óleo, muito possivelmente ela irá deslizar de forma rápida sobre a pele até atingir um determinado valor em que a viscosidade mantém-se uniforme, iniciando um comportamento newtoniano, representado no gráfico a partir de 50 seg^{-1} . Dentro desse sistema, que faz com que a fórmula se distribua por meio de uma camada fina, permite-se uma absorção homogênea, fornecendo um aspecto agradável e sedoso ao toque.

5.3.2 Solubilidade

Baseado na técnica proposta, o óleo apresentou-se solúvel no etanol 90% na proporção 1:1, sendo esse resultado importante para análises de qualidade do óleo em estudo.

5.3.3 Densidade

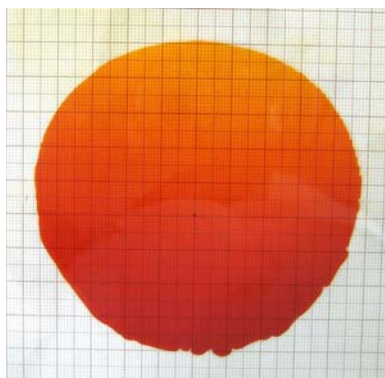
A densidade é uma propriedade física importante e pode ser utilizada para distinguir um material puro de um impuro. Ela também pode ser utilizada na identificação e no controle de qualidade de um determinado produto industrial, bem como ser relacionada com a concentração de soluções.

Para determinação da densidade do óleo foram feitas oito medições e o resultado obtido foi 0,95 g/mL, a uma temperatura de 25°C. Comparando com referência consultada⁹, cuja especificação é de 0,95 a 0,99 g/mL, a densidade encontrada está de acordo com o estabelecido.

5.3.4 Espalhabilidade

As medidas foram realizadas em triplicata e o resultado obtido para o óleo foi uma área de 6.500,59 mm². A figura 21 mostra seu comportamento sob a placa após o tempo de um minuto.

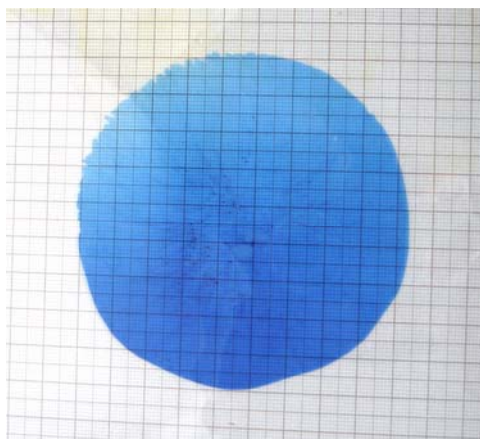
FIGURA 21 – ESPALHABILIDADE DO ÓLEO DE *Bixa orellana*



⁹ Distriol Comércio de Insumos Ltda.

O mesmo procedimento foi realizado com óleo de amêndoas, conforme figura 22, para fins de comparação, uma vez que é um óleo muito utilizado em formulações cosméticas. Esse óleo foi colorido artificialmente para melhor visualização.

FIGURA 22 – ESPALHABILIDADE DO ÓLEO DE AMÊNDOAS



O óleo de amêndoas forneceu uma área de 6.644,24 mm². Considerando que quanto maior ela for, mais facilmente um produto se espalha sobre uma superfície, nota-se que ambos os óleos são bastante semelhantes nesse parâmetro. Portanto, esse resultado indica que o óleo de *B. orellana* é um produto que quando aplicado sobre uma superfície tem facilidade em se espalhar, característica essa bastante importante ao se propor uma formulação cosmética que o utilize em sua composição.

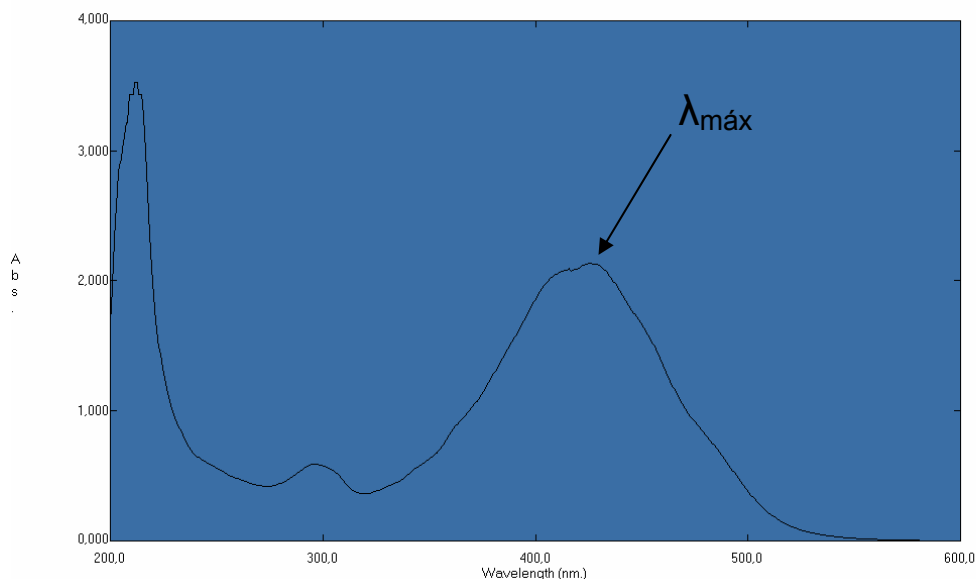
5.3.5 Análise em Espectroscopia de Ultravioleta

A figura 23 apresenta a varredura em espectrofotômetro de UV do óleo de *B. orellana*, nos comprimentos de onda de 200 a 600 nm.

Como pode-se notar, o $\lambda_{\text{máx}}$ foi em 424 nm, seguido de um segundo pico em 297,5 nm.

Outros comprimentos de onda foram marcados a fim de aplicar o método de MANSUR et al. (1986) para determinação espectrofotométrica do FPS do óleo.

FIGURA 23 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE UV DO ÓLEO



Dentre várias técnicas *in vitro* para determinação de FPS, a espectrofotométrica é uma das mais aplicáveis por ser um processo simples, rápido, barato e sem riscos, que fornece um resultado confiável em alguns minutos. Trata-se de uma análise que permite uma previsão do fator de proteção antes de se realizarem os testes em humanos, reduzindo os riscos para esses últimos. De fato, esse método ignora alguns fatores que interferem diretamente no FPS, como a capacidade de aderência, penetração e distribuição do produto na pele. Contudo, LOWE e BREEDING (1983) demonstraram boa correlação entre a espectrofotometria e os testes em humanos.

De acordo com MANSUR et al. (1986), por meio de uma análise em espectrofotômetro pode-se determinar o FPS de protetores solares. Estudos realizados com o óleo indicam que ele apresenta uma atividade anti-radicaís livres que impede os danos causados pela radiação UV sobre os queratinócitos da pele.¹⁰

De acordo com a técnica, para substâncias de caráter lipofílico deve-se utilizar éter como solvente. Entretanto, uma adaptação foi necessária, pois em razão da rápida volatilidade do éter, as medidas também foram realizadas usando metanol. A amostra foi totalmente solubilizada nos dois solventes.

¹⁰ Dados obtidos da literatura técnica do fornecedor, Croda.

O FPS obtido para as análises que utilizaram éter foi de 8, enquanto que com o metanol foi 6. Com o metanol, os valores de absorbância obtidos mantiveram-se constantes durante as três análises, o que não aconteceu quando se utilizou o éter.

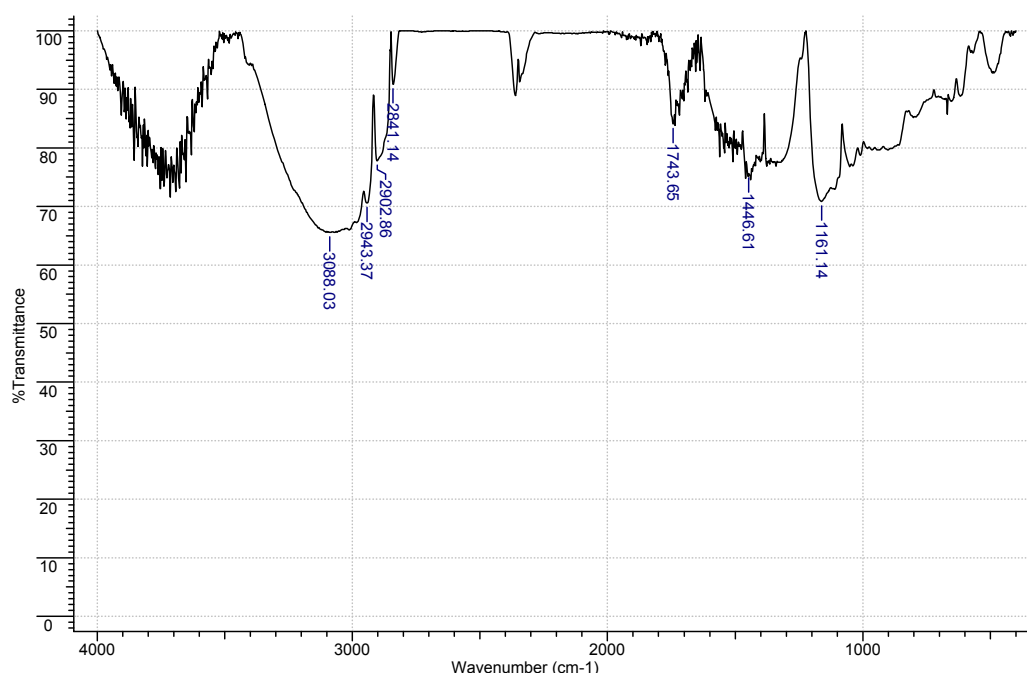
Essa diferença ocorreu provavelmente em razão do éter ser muito volátil, e com isso o resultado obtido com esse solvente não pode ser considerado totalmente correto. De acordo com MANSUR et al. (1986), a precisão do método para substâncias oleosas diminui um pouco justamente em razão da volatilidade do éter, que provoca uma concentração do produto. Dessa forma, o resultado mais confiável parece ser o da amostra com metanol, e, portanto, pode-se considerar que, pelo método espectrofotométrico, o óleo de *B. orellana* apresenta um FPS igual a 6.

5.3.6 Análise em Espectroscopia de Infravermelho

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. Para análise de substâncias orgânicas faz-se geralmente uma varredura de 4000 a 666 cm^{-1} (SILVERSTEIN et al, 1994). Essa análise contribui, juntamente com outros ensaios, para identificação de compostos químicos e descobrimento de novas estruturas.

O espectro de absorção de IV do óleo de *B. orellana* encontra-se na figura 24.

FIGURA 24 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE IV DO ÓLEO EM KBr



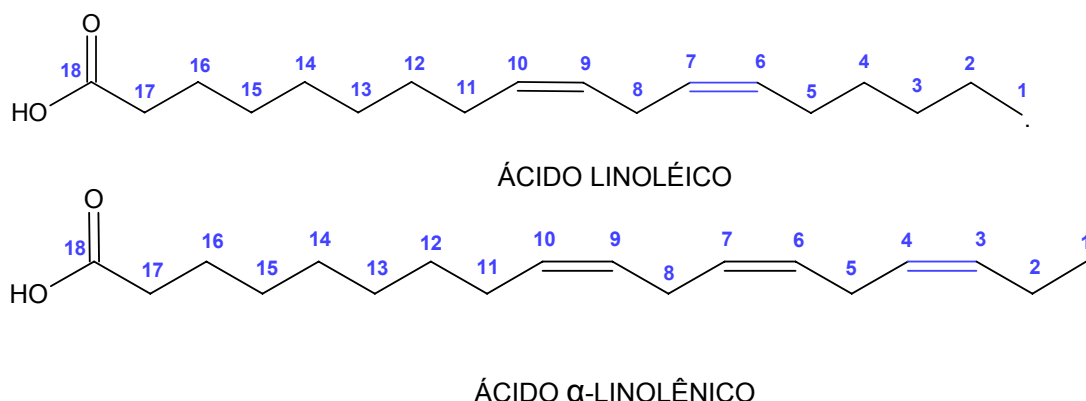
Analisando-se o espectro nota-se a presença de uma banda larga em $3088,03\text{ cm}^{-1}$, de deformação axial do grupamento hidroxila. Em seguida tem-se as absorções em $2943,37$, $2902,86$ e $2841,14\text{ cm}^{-1}$ das metilas e metilenos alifáticos. A banda característica da carbonila encontra-se em $1743,85\text{ cm}^{-1}$. Esses grupamentos identificados estão presentes na estrutura química dos corantes bixina e norbixina.

5.4 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são moléculas lineares que podem ter de 4 a 22 carbonos em sua estrutura. São classificados como saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) ou poliinsaturados (AGPI). Com exceção dos AGS e AGMI, os AGPI, em especial o linoléico (AL) e o α -linolênico (AAL), não são sintetizados endogenamente pelos seres humanos e são chamados de ácidos graxos essenciais (AGE). Esses ácidos têm grande importância farmacológica, pois participam de reações inflamatórias, estão relacionados à resistência imunológica, distúrbios metabólicos, processos trombóticos e doenças neoplásicas. Em contraposição, são alvos preferenciais da peroxidação lipídica devido às suas insaturações, resultando em radicais livres danosos aos tecidos (HIRAYAMA et al., 2006). De acordo com TINOCO et al. (2007), a carência de AGE especialmente nos humanos pode originar alterações no crescimento, na pele, distúrbios imunológicos, neurológicos, além de sérios transtornos comportamentais.

Os ácidos linoléico (18:2, n-6) e α -linolênico (18:3, n-3), representados na figura 25, pertencem às famílias n-6 (ômega 6) e n-3 (ômega 3), que abrangem ácidos graxos que apresentam a primeira insaturação no sexto e terceiro carbonos respectivamente, enumerados a partir do grupo metil terminal. Eles são obtidos pela dieta e produzem no organismo outros AGPIs (pela ação de enzimas alongases e dessaturases), que desempenham importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. As alongases agem adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia, enquanto que as dessaturases oxidam dois carbonos, originando uma dupla ligação. Dentre esses AGPIs, destaca-se o ácido aracdônico (20:4 n-6, ARA), originado a partir do AL, e os ácidos eicosapentaenóico (20:5 n-3, AEP) e docosahexaenóico (22:6 n-3, ADH), ambos originados do AAL (MARTIN et al., 2006).

FIGURA 25 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÁCIDOS LINOLÉICO E α -LINOLÊNICO



FONTE: MARTIN et al. (2006), 763

No reino vegetal é bastante comum a síntese do AL, ocorrendo também a sua conversão para AAL pela ação de uma dessaturase (TINOCO et al., 2007).

No óleo em estudo, além do AL, também foram encontrados AGS, AGM e AGPI, conforme tabela 4, que também apresenta suas respectivas concentrações.

TABELA 4 – TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO

COMPONENTE	FÓRMULA MOLECULAR	CONCENTRAÇÃO (%)	CONC DA LITERATURA (%) ⁽¹⁾
Ácido Linoléico (C 18:2)	$C_{18}H_{32}O_2$	19,5	19,4
Ácido Palmítico (C16:0)	$C_{16}H_{32}O_2$	15,5	19,3
Ácido Oléico (C18:1)	$C_{18}H_{34}O_2$	8,1	15,5
Ácido Esteárico (C18:0)	$C_{18}H_{36}O_2$	7,1	13,0
Ác Aracdônico (C20:4)	$C_{20}H_{32}O_2$	2,4	-

(1) MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, I. L. Ácidos graxos e algumas oleaginosas tropicais em ocorrência no nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 15, n. 3, p. 181-185, 1992.

Os ácidos graxos listados correspondem aos de maior concentração no óleo. Primeiramente está o AL, com aproximadamente 19%, seguido do ácido palmítico. Os ácidos oléico e esteárico também estão em quantidades significativas. As concentrações foram comparadas com os resultados encontrados por MATOS et al. (1992), que utilizaram a mesma forma de extração do óleo de *B. orellana* e identificação dos ácidos graxos. Algumas diferenças podem ser notadas, pois existem diversas variedades da espécie. Além disso, a época em que os frutos

foram colhidos pode não ter sido a mesma, o que também interfere nas quantidades de seus componentes. O ARA foi identificado na amostra testada, porém não foi citado em nenhuma literatura consultada.

O ARA é bastante importante nos sistemas biológicos, pois é precursor dos eicosanóides, como prostaglandinas e tromboxanos, que são produzidos pelos tecidos em situações de inflamação, infecção, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária (HIRAYAMA et al., 2006). Esse ácido também está intimamente relacionado com o desenvolvimento do cérebro e da retina durante o período gestacional e nos primeiros anos de vida, pois os fosfolipídeos associados aos neurônios são altamente enriquecidos com ele, o que tem sugerido sua participação na transmissão sináptica (MARTIN, et al., 2006). Além disso, de acordo com TINOCO et al. (2007), o ARA é essencial pela sua função de sinalização e divisão celular.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na técnica de difusão em ágar, notou-se que as regiões logo ao redor dos discos contendo as amostras de óleo apresentaram-se bastante pigmentados, com a coloração característica do urucum, o que dificultava a visualização de um possível halo de inibição bacteriana. Mesmo assim, não pareceu ter havido algum tipo de inibição de crescimento até a concentração de 1mg. Portanto, não se fez necessário testar concentrações maiores, pois a pesquisa de novas substâncias antimicrobianas é interessante a partir do momento que se prova sua ação em concentrações na ordem de micro e pico gramas. Além disso, a coloração vermelha seria acentuada, dificultando ainda mais a análise correta dos resultados.

Também não se pode dizer que não houve a migração do óleo para o ágar, pois este foi solubilizado com Tween[®] 80, responsável pela difusão no meio. Caso esse fato não tivesse ocorrido, não seria notada a presença da coloração vermelha ao redor dos discos. Os controles positivo, negativo e de esterilidade comportaram-se conforme esperado, ou seja, o controle negativo não inibiu o crescimento, o positivo formou halo de inibição e o de esterilidade não mostrou crescimento microbiano.

Em relação a técnica da CMI, todos os tubos contendo amostra turvaram, indicando que nas concentrações testadas, o óleo também não inibiu crescimento bacteriano.

Portanto, não se evidenciou atividade antimicrobiana do óleo pelas duas técnicas utilizadas. Além disso, alguns trabalhos que tratam dessa atividade com *B. orellana* mostram resultados positivos somente com outras partes da planta (COELHO et al., 2003; GARCIA et al., 2003).

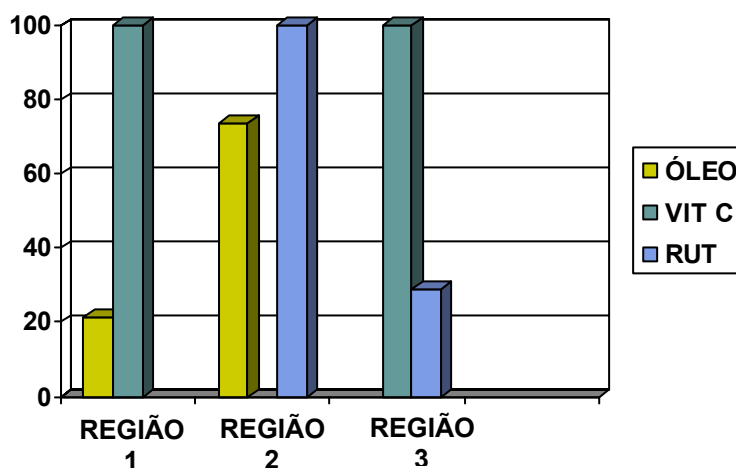
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.6.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênico

Esse método é considerado simples, de baixo custo e usado para comparar a capacidade antioxidante de diversos extratos. De acordo com PRIETO, PINEDA e AGUILAR (1999), a determinação quantitativa baseia-se na redução do molibdênio (VI) para molibdênio (V) pela amostra analisada, com subsequente formação de um complexo verde fosfomolibdênico (V) em pH ácido, que é determinado espectrofotometricamente por UV a 695 nm.

O gráfico 3 apresenta os valores da atividade antioxidante relativa do óleo frente aos padrões utilizados.

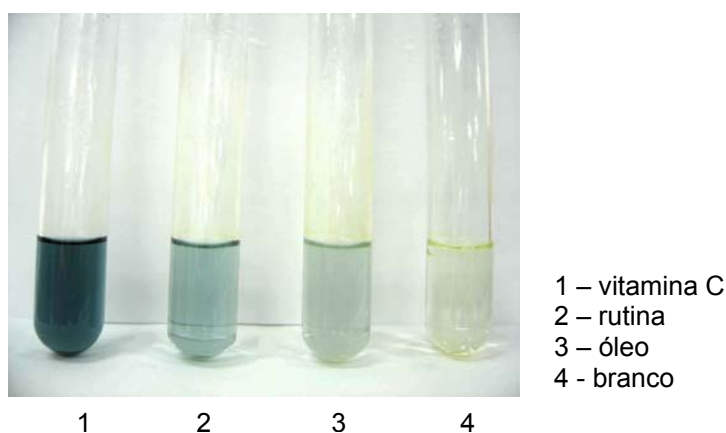
GRÁFICO 3 – ATIVIDADES ANTIOXIDANTES RELATIVAS DETERMINADAS PELO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNICO



Considera-se que a vitamina C apresenta atividade de 100% por ser uma substância de potente ação antioxidante (PRIETTO, 1999). Já a rutina, embora também apresente essa atividade, obteve uma AAR de aproximadamente 29% em relação à vitamina C, conforme indicado na região 3 do gráfico. O óleo, por sua vez, quando comparado à vitamina C, possui uma AAR de 21,5% (região 1) e de 73,7% em relação à rutina (região 2).

Se compararmos a atividade da rutina e do óleo em relação à vitamina C (regiões 3 e 1, respectivamente), nota-se que ambos apresentam resultados semelhantes, o pode também ser visualizado pela alteração de cor das soluções após os 90 minutos de reação. Mesmo durante a realização do ensaio, pode-se notar a mudança da cor inicial levemente amarelada para a cor verde/azulada, característica da formação do complexo fosfomolibdênico. Quanto mais intensa a coloração, maior a atividade antioxidante do composto. A figura 26 mostra as colorações finais.

FIGURA 26 – FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO



Após o resfriamento dos tubos, pode-se notar a forte coloração no tubo 1, como esperado em razão da potente ação antioxidante da vitamina C, seguida de um azul menos intenso no tubo 2 contendo rutina. O óleo testado (tubo 3) apresentou uma cor semelhante a esse flavonóide, porém com tonalidade levemente inferior.

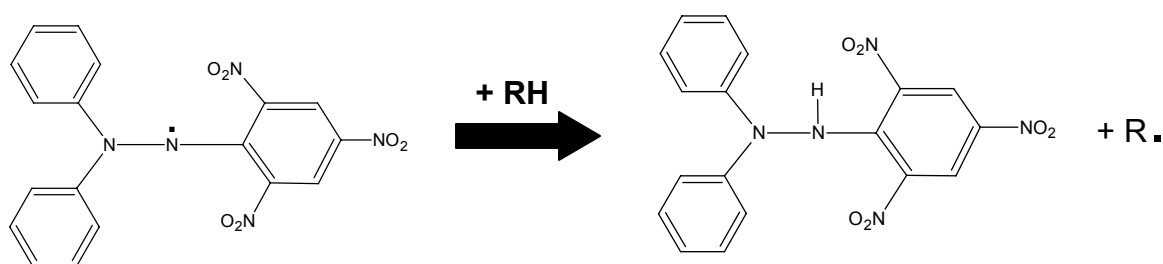
Nesse aspecto, pode-se concluir que o óleo apresenta atividade antioxidante, a qual está muito próxima da ação da rutina.

5.6.2 Redução do Radical DPPH

5.6.2.1 Análise qualitativa

O DPPH é um radical estável que, quando em contato com uma substância antioxidante doadora de hidrogênio, pode ser reduzido em meio alcoólico, formando difenil picrilhidrazina de acordo com a representação da figura 27.

FIGURA 27 – REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

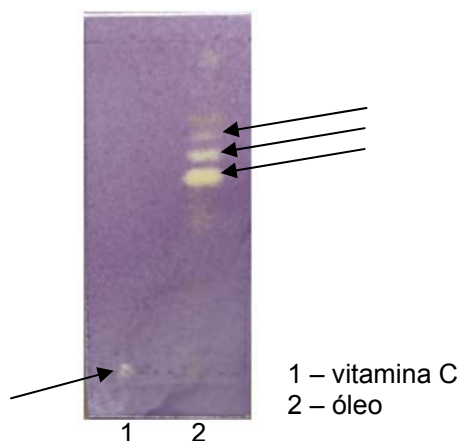


FONTE: ADELMANN, 2004

Essa redução é acompanhada em comprimentos de onda de 517 a 520 nm pela diminuição da absorbância, uma vez que ocorre uma mudança na coloração violeta (característica do radical) para amarela enquanto a reação se processa. A intensidade da coloração é proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante (HIRATA, 2004).

A figura 28 apresenta a cromatoplaca após revelação com DPPH.

FIGURA 28 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO ÓLEO UTILIZANDO VITAMINA C COMO PADRÃO



Como pôde ser observado nas indicações, pelo menos três manchas amarelas apareceram após a revelação, indicando a presença de compostos antioxidantes no óleo em estudo. A fase móvel escolhida foi adequada para a análise, uma vez que permitiu uma boa resolução e conseqüente separação de diversas substâncias. Embora essa fase não tenha sido apropriada para a vitamina C, pode-se notar que mesmo não ascendendo na cromatoplaca, sua mancha correspondente apresentou-se amarela, confirmando a redução do DPPH.

5.6.2.2 Análise quantitativa

Várias formas de apresentação de resultados são permitidas quando se utiliza o ensaio quantitativo com DPPH. Nesse trabalho, o resultado foi expresso pelo valor de IC_{50} , ou seja, a porcentagem de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. Quanto menor for esse valor, maior é a capacidade antioxidante da substância.

A equação da reta obtida do gráfico AA% *versus* concentração da amostra foi:
 $y = 27,877x + 5,9183$

Considerando que o valor de y é 50, tem-se como resultado 1,58 mg/mL. Isso significa que para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH, é necessária uma concentração de óleo de aproximadamente 1,6 mg/mL.

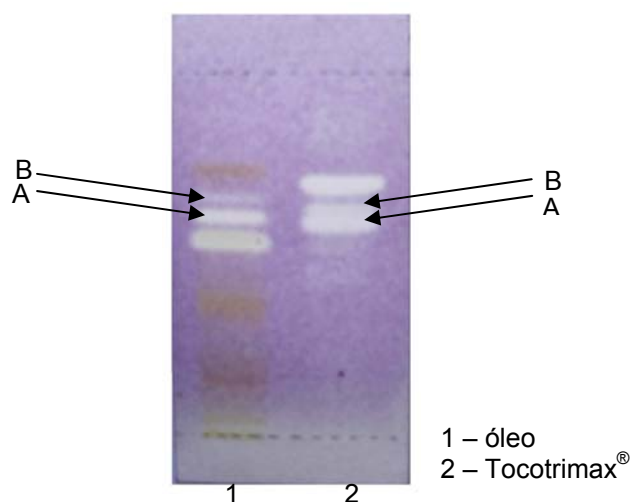
O mesmo procedimento realizado com a amostra foi feito com dois padrões, a vitamina C e a rutina, e os valores de IC_{50} encontrados foram de 0,49 µg/mL e 4,14 µg/mL, respectivamente. Se compararmos esses valores com o resultado da amostra, nota-se que o óleo, ainda que apresente atividade antioxidante considerável conforme mostrou o ensaio qualitativo, apresenta-se menos potente do que os padrões testados.

5.6.3 Pesquisa de Tocotrienol e Tocoferol

Na tentativa de identificar quais são os compostos antioxidantes do óleo e sabendo-se da presença de tocotrienóis na sua composição (FREGA; MOZZON; BOCCI, 1998), foi realizada uma CCD utilizando como padrão o composto

Tocotrimax[®], conforme mostra a figura 29. Essa matéria-prima é obtida do farelo de arroz e contém no mínimo 7% de tocoferóis e 8% de tocotrienóis.

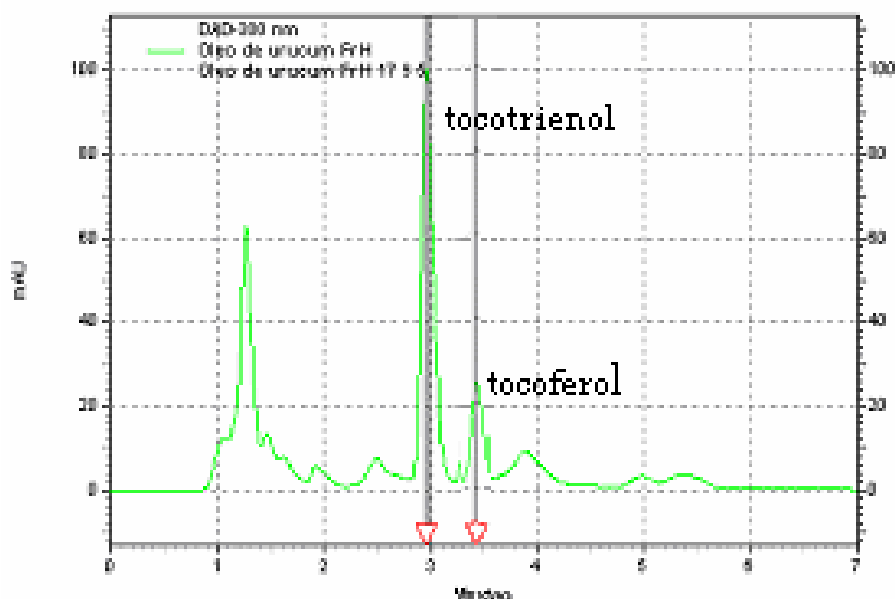
FIGURA 29 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO ÓLEO UTILIZANDO PADRÃO COMERCIAL DE TOCOTRIENOL/TOCOFEROL



Tomando-se como base os valores de R_f calculados, tanto para as substâncias presentes na amostra quanto para o padrão, sugere-se a presença de tocotrienol e/ou tocoferol no óleo. No entanto, essa técnica não permite fornecer resultado confirmatório.

A confirmação da presença desses compostos foi obtida por CLAE. Tanto o padrão Tocotrimax[®] quanto a amostra foram preparados na concentração de 1 mg/mL e injetados 20 µL. Por comparação e sob as mesmas condições experimentais, identificou-se a presença dos tocotrienóis e tocoferóis no óleo, nos tempos de retenção de aproximadamente 3 e 3,4 min, como mostra o cromatograma da figura 30. Nota-se a presença de maior quantidade de tocotrienol em relação ao tocoferol no óleo em estudo.

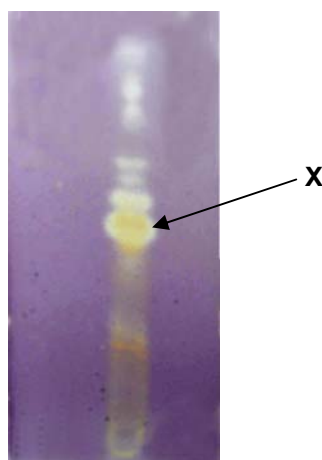
FIGURA 30 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DO ÓLEO MARCANDO TOCOTRIENOL E TOCOFEROL



5.6.4 Isolamento e Identificação do Composto Antioxidante “X”

A figura 31 mostra uma CCD realizada nas mesmas condições experimentais do item 5.6.3. Pode-se visualizar que dentre as várias manchas claras, a indicada pela letra “X” ($R_f = 0,47$) está presente em maior concentração.

FIGURA 31 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA REVELAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES NO ÓLEO



Uma cromatografia em coluna foi realizada com o intuito de separar esse composto. Assim, após a eluição completa, obteve-se frações de aproximadamente

10mL, que foram colocadas em banho-maria a 40 °C até a evaporação total do solvente. A cada duas frações foram feitas CCDs usando uma solução de DPPH para revelação com a intenção de verificar a semelhança de conteúdo. A visualização das cromatoplacas foi feita em lâmpada UV a 360nm. Em seguida, as frações semelhantes foram reunidas, dissolvendo-se os resíduos em clorofórmio.

A figura 32 apresenta algumas CCDs realizadas em frações subseqüentes, mostrando, nas indicações, a separação do composto pesquisado.

FIGURA 32 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE FRAÇÕES SUBSEQÜENTES OBTIDAS DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA

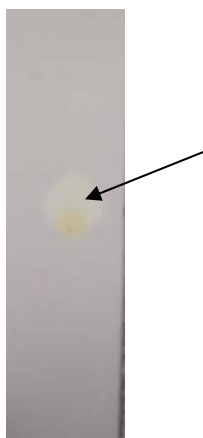


Como nas cromatoplacas acima havia outro composto além da substância pesquisada, foi realizada nova cromatografia em coluna somente com essas frações. Para esse ensaio, foi utilizada uma coluna a vácuo, na qual a pastilha foi eluída com a mesma fase móvel *hexano:acetato de etila:ácido fórmico (85:20:3)*. As CCDs das primeiras dez frações obtidas já indicavam a presença isolada do composto em questão. As frações semelhantes foram reunidas e o solvente foi evaporado.

Para purificar o composto “X”, realizou-se uma cromatografia preparativa removendo-se a sílica da região da cromatoplaça onde a substância estava localizada. A exposição da cromatoplaça sob a lâmpada UV auxiliou para melhor demarcação da região a ser raspada. Para separar a sílica do composto, o resíduo raspado foi solubilizado em clorofórmio e filtrado em funil sinterizado G3.

Após evaporação do solvente realizou-se nova CCD, e o resultado pode ser visto na figura 33, que apresenta o composto antioxidante “X” isolado ($R_f = 0,47$).

FIGURA 33 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO COMPOSTO “X”
ISOLADO



Esse composto foi submetido à análise em RMN ^1H e ^{13}C .

No espectro de RMN de ^1H da figura 34, na região aromática em torno de 7 ppm, observou-se um dubleto em 6,37 ppm e um dubleto em 6,47 ppm, correspondendo aos hidrogênios H5 e H7, respectivamente. Observou-se também sinal de um grupo metílico ligado ao anel aromático em 2,12 ppm atribuído ao carbono C8. A ausência de outros sinais na região aromática evidenciou a presença de hidrogênio substituído no carbono C6 atribuído ao grupo hidroxila (OH).

Notou-se também, na região alifática do espectro de RMN entre 0,6 – 2,8 ppm, sinais de prótons em 1,70 – 1,84 ppm (multiplete) e 2,69 ppm (triplete) atribuídos aos hidrogênios H3 e H4, respectivamente. Outro sinal em 1,25 ppm identificou o grupo metila no carbono C2, enquanto os outros grupos metilas da cadeia alifática mostraram sinais entre 0,8 - 0,9 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C e DEPT representados nas figuras 35 e 36, respectivamente, apresentaram sinais de deslocamento químico entre 115 a 148 ppm referentes aos carbonos do anel aromático C5, C6, C7, C8, C9 e C10, e aos carbonos vinílicos C3', C4', C7', C8', C11' e C12'. Também apresentaram sinais de deslocamento químico entre 14,1 a 26,0 ppm referentes aos carbonos metílicos (CH_3) da estrutura.

No espectro bidimensional COSY (^1H - ^1H), apresentado na figura 37, notou-se a correlação dos prótons de H3', H7' e H11' com H2', H6', H10'. Também foram observados os grupos metílicos ligados às duplas ligações, assim como a correlação de sinais de prótons dos hidrogênios H3 e H4.

No mapa de correlação bidimensional HMQC (^1H - ^{13}C) da figura 38 observou-se as correlações de hidrogênio em 6,37 ppm com sinal de carbono em 112,7 ppm e 6,47 ppm com 115,8 ppm atribuídos aos carbonos C5 e C7, respectivamente. Notou-se também as correlações de hidrogênio em 1,25 ppm com sinal de carbono em 24,2 e 31,5 ppm atribuídos a C2' e C1', respectivamente, localizando a metila em C2. O sinal de H em 5,05 – 5,15 ppm correlacionou-se com os sinais de carbono em 124,6; 124,5 e 124,4 ppm, atribuídos respectivamente aos C3', C7' e C11'.

O sinal de H em 2,69 (t) ppm e 1,70-1,84 (m) correlacionaram-se com sinal de carbono em 22,7 e 31,5 ppm atribuídos aos carbonos C4 e C3, respectivamente. O sinal de H em 1,94 – 2,09 (m) ppm correlacionaram-se com sinais de carbono em 26,9; 39,93 e 39,9 ppm, localizando os carbonos C2', C6' e C10', respectivamente. Os sinais de H em 2,12 ppm está correlacionado com sinal de carbono em 22,7 ppm atribuído ao carbono C2, localizando o grupo metila em C8 e o sinal de H em 1,68 ppm está correlacionado com sinal de carbono em 25,9 ppm, atribuído ao carbono 12'-CH₃, localizando o grupo metila em C12'.

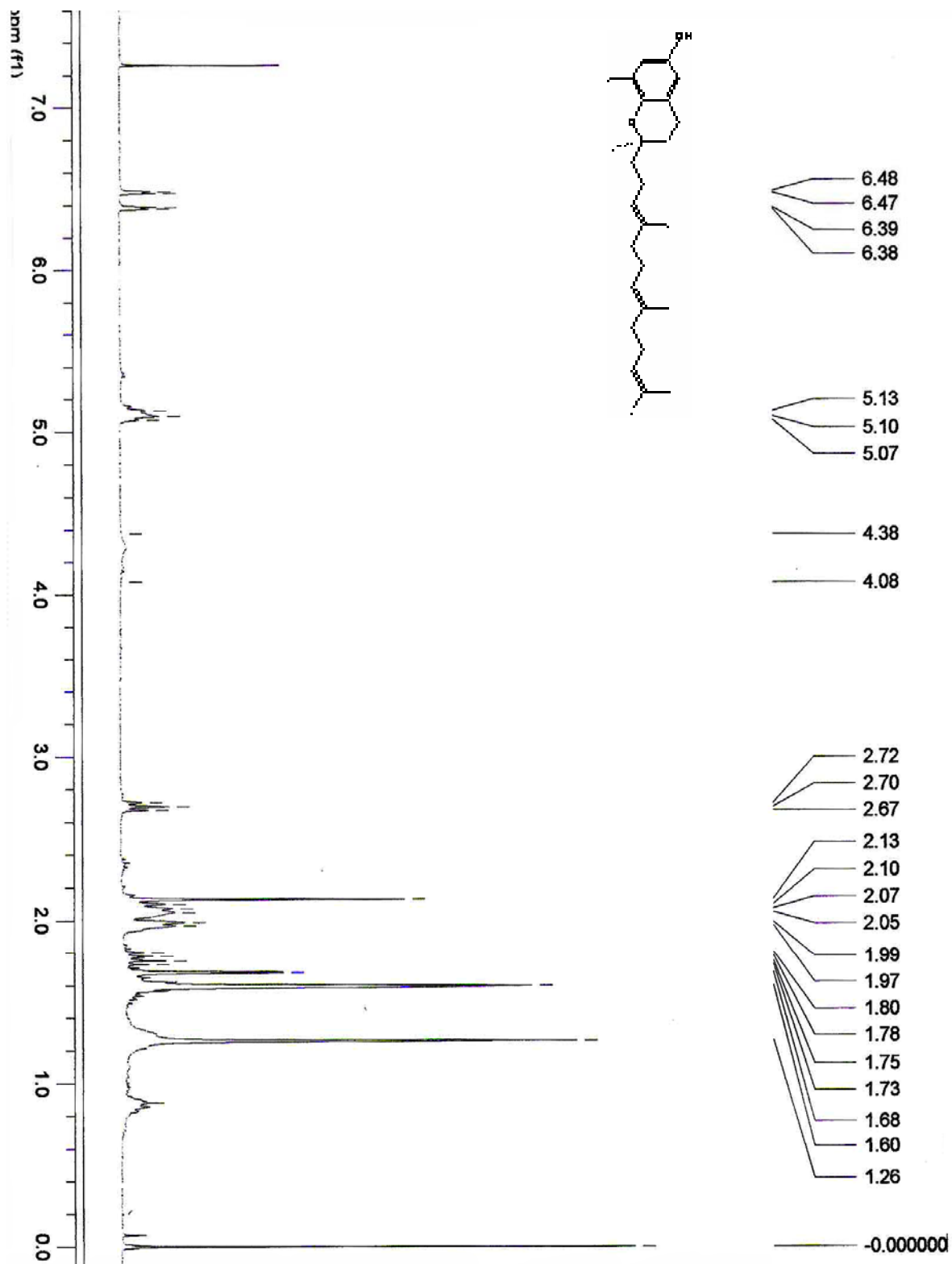
FIGURA 34 – ESPECTRO DE RMN ^1H DO COMPOSTO “X” (300MHz, CDCl_3)

FIGURA 36 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (DEPT) DO COMPOSTO “X” (75MHz, CDCl_3)

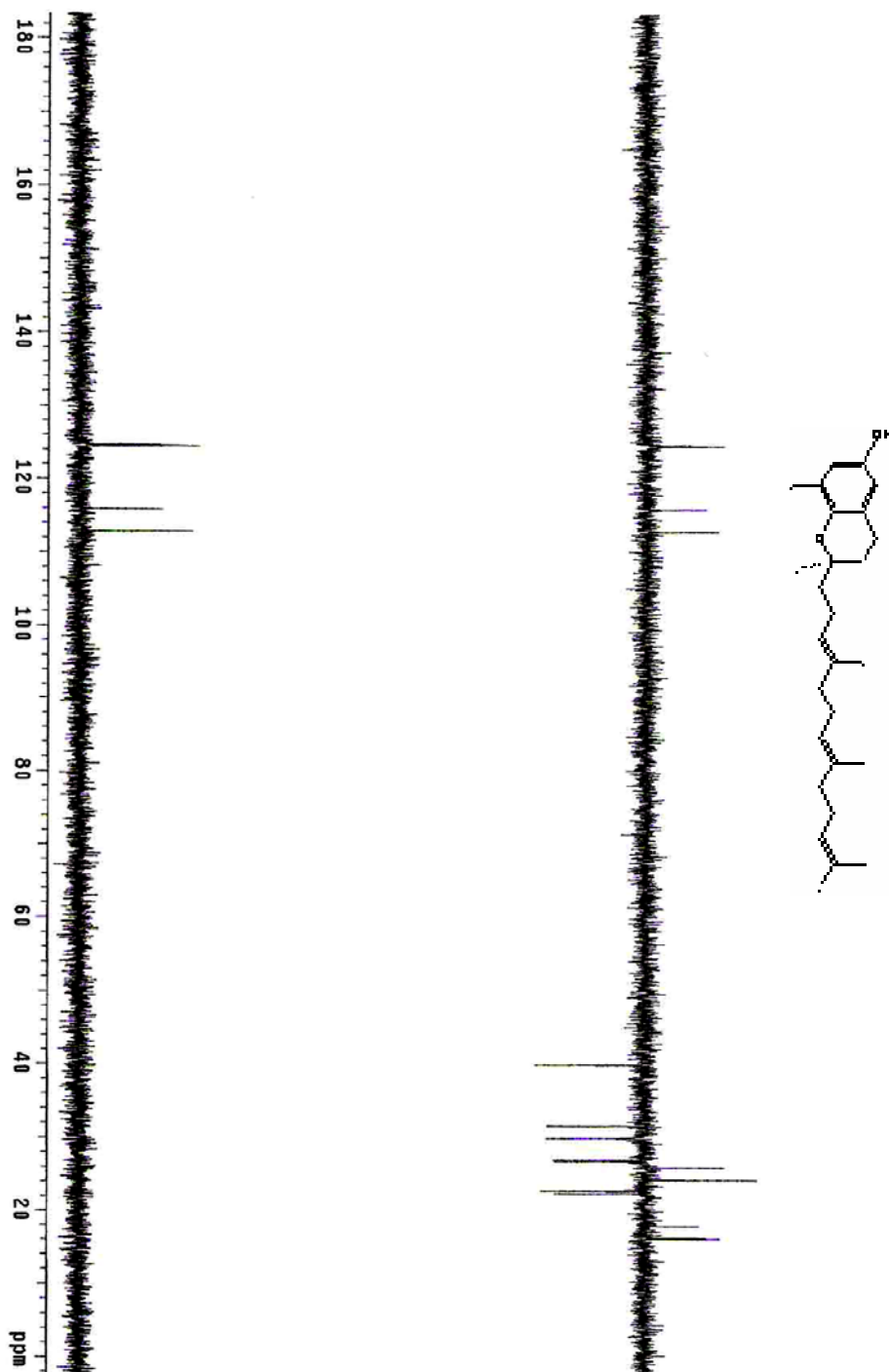


FIGURA 37 – MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL ^1H - ^1H (COSY) DO COMPOSTO "X" (300MHz, CDCl_3)

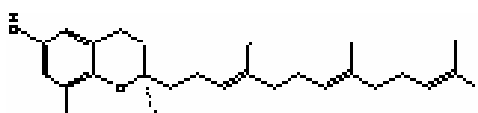
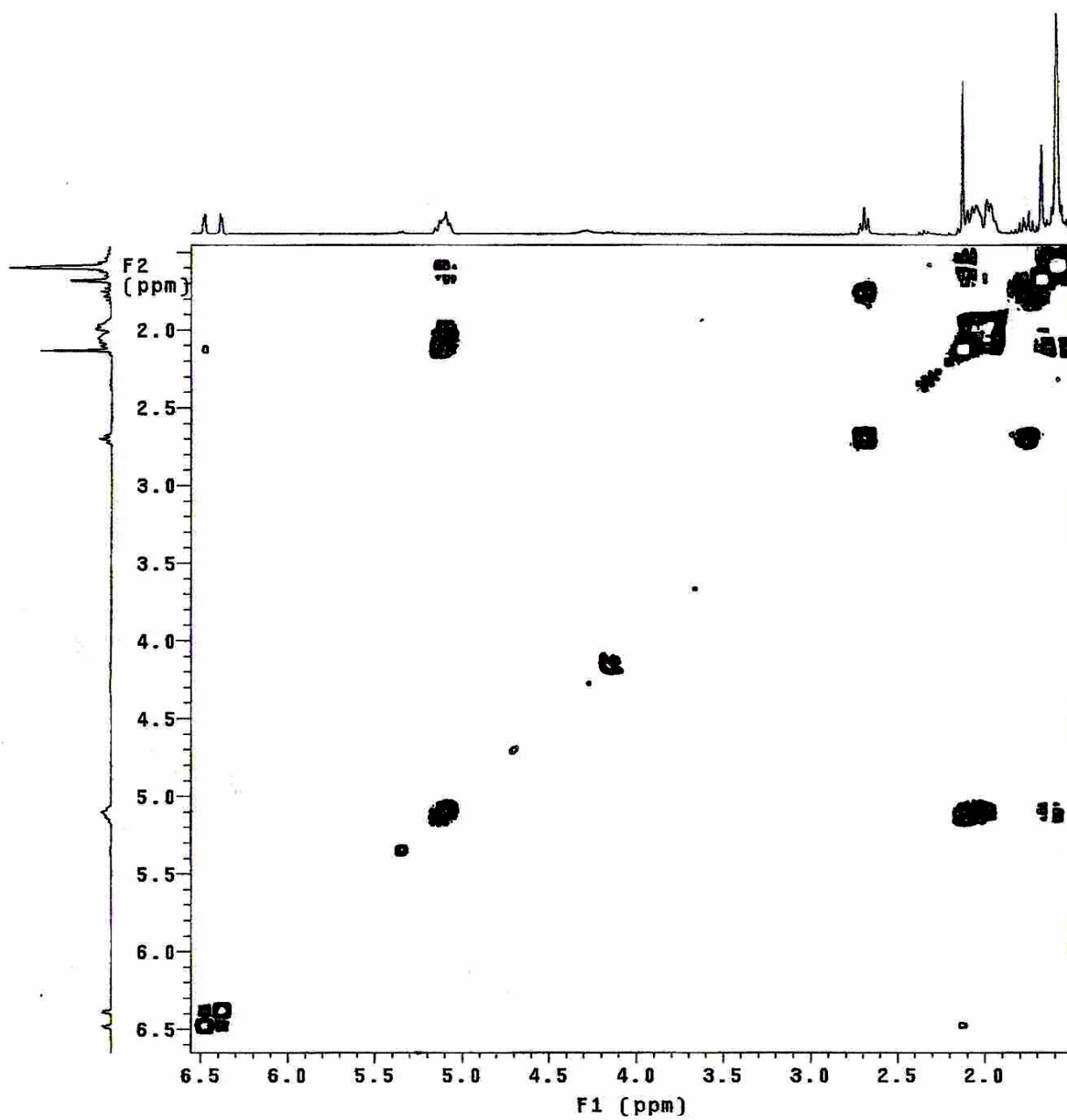
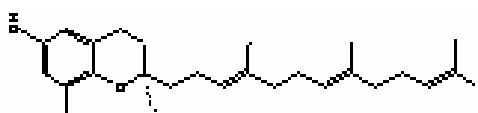
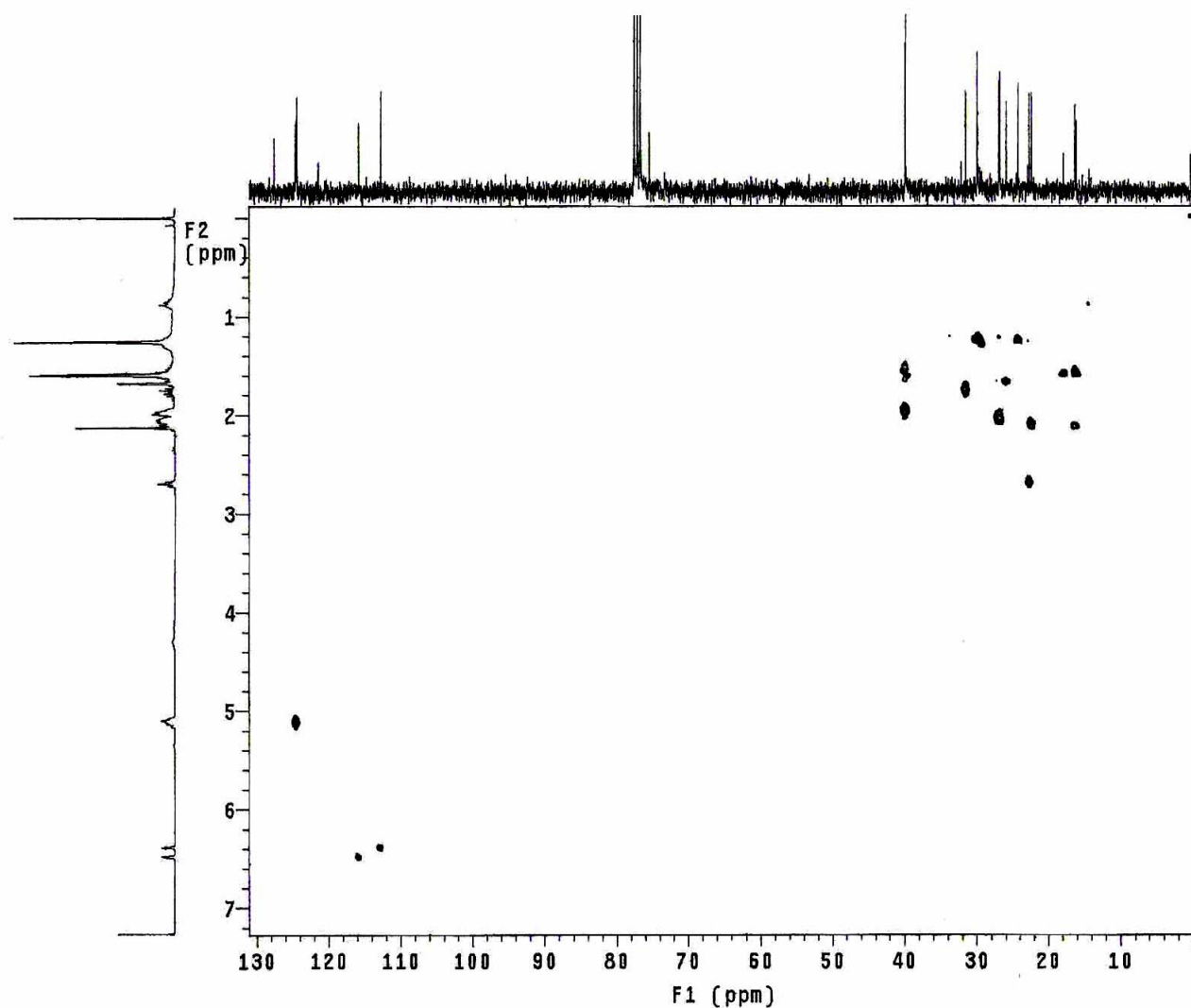


FIGURA 38 – MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL ^1H - ^{13}C (HMQC) DO COMPOSTO “X” (CDCl_3)



A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY e HMQC, comparados com dados de literatura, permitiu estabelecer a substância analisada como sendo o δ tocotrienol, conforme tabela 5.

TABELA 5 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C E CORRELAÇÃO HMQC E COSY DO COMPOSTO “X” COM DADOS DE LITERATURA

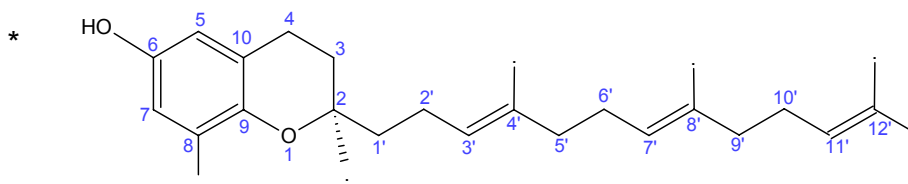
CARBONO*	¹³ C ^a	¹³ C ^b	¹ H ^a	¹ H ^c	¹ H ^d	COSY (¹ H - ¹ H)	HMQC (¹ H- ¹³ C)
2	75,5	74,6					
3	32,1	32,4	1,70 – 1,84 m	1,6 – 1,8 m	1,75 m	H ₄	31,5
4	26,9	25,7	2,69 t	2,63 t	2,69 t	H ₃	22,7
5	112,7	114,9	6,37 d	6,31 d	6,37 d		112,7
6	146,2	144,4					
7	115,8	119,5	6,47 d	6,41 d	6,47 d		115,8
8	127,6	122,2					
9	147,9	145,5					
10	121,4	122,2					
1'	31,5	31,9	1,48 – 1,56 m				
2'	24,2	24,5	1,94 -2,09 m	1,90 – 2,20 m		H _{3'}	26,9
3'	124,6	124,0	5,05 – 5,15 m				124,5
4'	135,3	135,2					
5'	39,93	37,4	1,48 – 1,56 m				
6'	26,8	25,7	1,94 -2,09 m	1,90 – 2,20 m		H _{7'}	39,93
7'	124,5	124,0	5,05 – 5,15 m	5,04 m			124,6
8'	135,2	135,2					
9'	39,9	37,5	1,48 – 1,56 m				
10'	26,8	25,7	1,94 -2,09 m	1,90 – 2,20 m		H _{11'}	39,9
11'	124,4	124,1	5,05 – 5,15 m				124,4
12'	131,5	131,0					
12' – Me	17,9	17,0	1,68 s	1,60 s			17,9; 25,9
12' – Me	25,9	26,0	1,59 s	1,52 s			
8' – Me	14,3	14,1	1,59 s	1,52 s			
4' – Me	16,0	14,0	1,59 s	1,52 s			
2 – Me	22,7	23,5	1,25 s	1,18 s	1,25 s		24,2; 31,5
8 – Me	16,1	11,8	2,12 s	2,06 s	2,12 s		22,7
n – Me			0,8 – 0,9 m		0,8 – 0,9 m		14,3

^a Os dados do espectro de RMN de ¹H e ¹³C foram realizados a 300 MHz e 75 MHz, respectivamente, CDCl₃, TMS, ppm.

^b CARVALHO, M.G. de; et al. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, v.21, n.6, 1998.

^c SILVA, D.H.S. **Constituintes químicos de *Iryanthera sagotiana* e *Iryanthera lacifolia***. São Paulo, 1997. 147 p. Tese(Doutorado) –Instituto de Química, USP.

^d STROHSCHNEIN, S. et al. Separation and identification of tocotrienol isomers by HPLC – MS and HPLC – NMR coupling. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 6, 1999.



5.7 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO COSMÉTICA

A escolha de desenvolver um produto labial baseou-se nas características identificadas no óleo de *B. orellana*. Somente o fato de ser um óleo vegetal já faz dessa matéria-prima um produto para hidratação labial, pois forma uma película que impede a perda de água transepidérmica (FONSECA; PRISTA, 1984). Além disso, a presença dos pigmentos de cor vermelho-alaranjado fornecerão a cor ao produto, dispensando a utilização de corantes sintéticos, que já tem seu uso sendo restringido nos últimos tempos. As substâncias antioxidantes irão auxiliar na prevenção do envelhecimento celular e sua capacidade de absorver radiação ultravioleta auxiliará na proteção solar.

Segundo PEYREFITTE, MARTINI e CHIVOT (1998): “O batom tem como objetivo modificar o aspecto normal dos lábios dando-lhe uma tez diferente, um reflexo mais ou menos brilhante, um brilho mais ou menos vivo”. É um símbolo da sensualidade feminina, sendo o mais consumido em relação aos esmaltes e sombras.

Ainda de acordo com esses autores, um batom é composto principalmente de um veículo gorduroso no qual estão dispersos os corantes. Existem diversos tipos de batons, alguns mais gordurosos que coram e brilham intensamente nos lábios, outros foscos, ou até hipoalergênicos. Nesse trabalho, desenvolveu-se um brilho para os lábios, ou gloss labial, que são mais transparentes e utilizados não para colorir, mas para modificar levemente a cor natural dos lábios.

O Versagel[®] apresenta excelente transparência, estabilidade térmica e é compatível com a maioria dos ingredientes cosméticos lipossolúveis, pois é altamente apolar. Sua propriedade de suspensão de partículas finas, como óxido de zinco, óxido de ferro e pigmentos, faz com que seja bastante aplicado industrialmente na produção de maquiagens.

Do ponto de vista reológico, o Versagel[®] é considerado termodinamicamente reversível. Quando submetido a aquecimento, ocorre um decréscimo de viscosidade, porém nunca chega à viscosidade zero, mesmo em altas temperaturas. Quando resfriado, volta a seu estado original sem perda de suas propriedades. Por

apresentar-se originalmente com uma consistência geleificada, promove maior oclusividade na região labial, ocasionando maior hidratação.¹¹

Duas fórmulas de gloss labial foram propostas: a primeira com uma consistência quase líquida (fórmula 1), que permite acondicioná-la em uma embalagem *roll-on*; e a outra com maior consistência (fórmula 2), isto é, que não escorre quando se vira o frasco que a contém. Essa diferenciação foi sugerida para dar a opção de dois tipos de aplicação do produto, uma vez que a fórmula mais consistente poderá ser aplicada com o auxílio de uma espátula ou de um pincel apropriado, enquanto que a forma mais líquida será embalada em frasco *roll-on* e aplicada diretamente sobre os lábios.

5.7.1 Composição

Os componentes das fórmulas desenvolvidas encontram-se na tabela 6.

TABELA 6 – FÓRMULAS DE GLOSS LABIAL

MATÉRIA –PRIMA	CONCENTRAÇÕES (%)	
	FÓRMULA 1	FÓRMULA 2
Versagel®	35	94
DC 1404	30	1
Vaselina líquida	30	-
Vit E oleosa	2	2
Óleo de <i>B. orellana</i>	2	2
Aroma líquido	qsp	qsp
Mica bronze	0,5	0,5

O óleo foi utilizado a 2% por ser uma concentração usual de óleos vegetais em cosméticos. Além disso, concentrações maiores influenciariam na coloração do produto, que seria muito mais intensa e esteticamente desagradável.

A fórmula 1 apresentou uma consistência mais fluida em razão da presença da vaselina líquida e do silicone DC 1404 (ciclometicone/dimeticone) em alta concentração, que além de hidratantes, favorecem a melhor espalhabilidade do produto sobre os lábios. A vitamina E oleosa atua como antioxidante e hidratante, e

¹¹ Dados obtidos da literatura técnica do fornecedor, Opção Fênix Distribuidora de Insumos Ltda.

a mica fornece um brilho por ser constituída de minúsculas partículas que ficam suspensas no produto. Sugere-se uma embalagem roll-on para esse produto.

Já na fórmula 2, o gloss tem aspecto geleificado, podendo ser armazenado em pequenos potes, e retirado com a ajuda de uma espátula ou com um pincel apropriado.

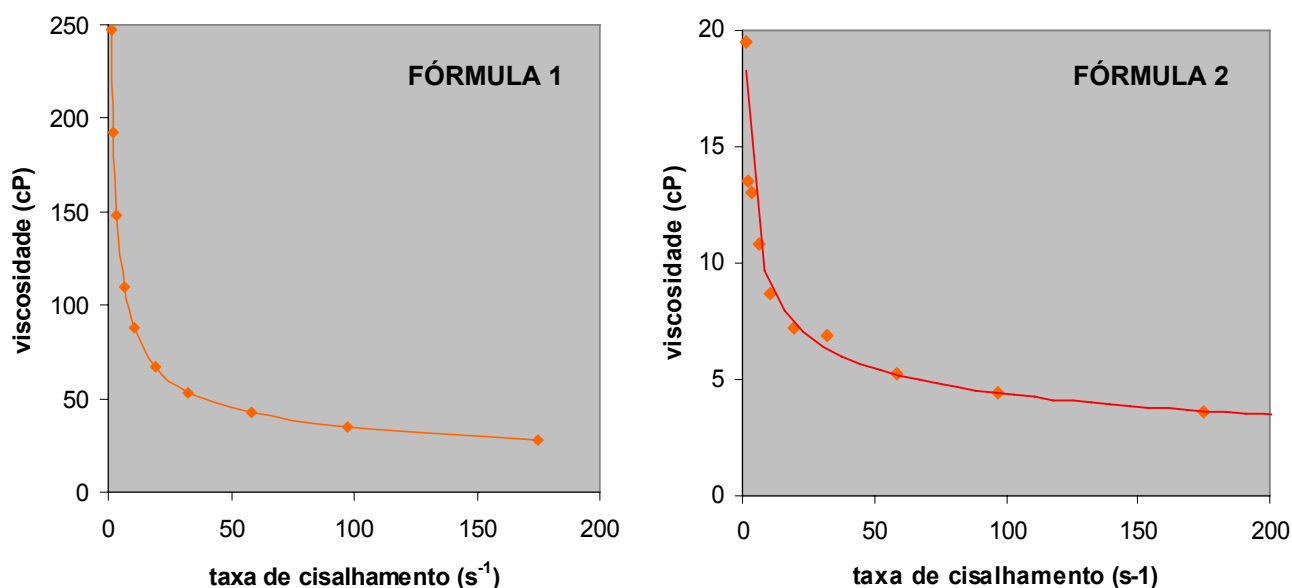
Não se faz necessária a adição de conservantes nas formulações, pois o veículo é constituído essencialmente de substâncias oleosas.

O aroma escolhido deve ser lipofílico. Na formulação 1 optou-se pelo aroma de chocolate e na fórmula 2, de canela.

5.7.2 Reologia

A reologia das fórmulas 1 e 2 encontram-se na figura 39.

FIGURA 39 – COMPORTAMENTO REOLÓGICO DAS FÓRMULAS 1 E 2



O comportamento reológico de ambas as fórmulas é bastante semelhante. Embora a fórmula 1 seja mais fluida, ela também inicia seu fluxo com um comportamento pseudoplástico, ou seja, há uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento.

Próximo aos $50 s^{-1}$, as fórmulas começam a se comportar de forma newtoniana, indicando que formarão um filme fino sobre a região labial, e

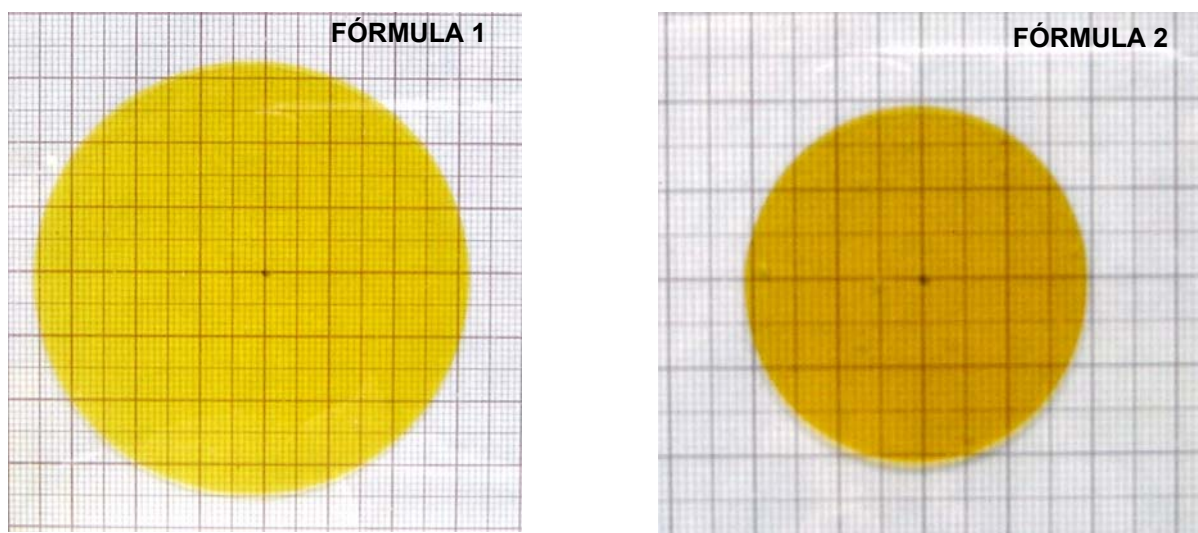
conseqüentemente irão proporcionar boa hidratação e facilidade na absorção de ativos que eventualmente serão incorporados a elas.

Importante ressaltar que nesses gráficos não se está analisando valores de viscosidade, mas sim a curva obtida. A escala do gráfico referente à fórmula 1 possui viscosidades diferentes das da fórmula 2, pois é coerente que a primeira tenha valores maiores por ser uma fórmula mais fluida.

5.7.3 Espalhabilidade

O teste de espalhabilidade das fórmulas 1 e 2 podem ser visualizados na figura 40.

FIGURA 40 – ESPALHABILIDADE DAS FÓRMULAS 1 E 2



Como pode ser observado, a fórmula 1 apresentou uma área de 754,4 mm², enquanto que a fórmula 2 atingiu apenas 314 mm².

Dessa forma, pode-se dizer que a espalhabilidade da fórmula 1 é maior e conseqüentemente torna-se mais fácil aplicá-la do que a formulação 2.

5.7.4 pH

A medida de pH em produtos dermatológicos é essencial, pois eles não devem alterar o pH cutâneo normal, que se encontra entre 4 e 6,5. Além disso, o pH

também interfere na conservação e estabilidade das formulações. Bons produtos são aqueles em que esse fator não se altera com o tempo, mesmo em longos períodos de armazenagem (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998).

Dessa forma, o pH determinado em ambas as formulações foi de 5,5, estando, portanto, dentro do padrão permitido.

5.7.5 Microfotografias

Algumas microfotografias foram realizadas com o objetivo de analisar a homogeneidade das fórmulas desenvolvidas. As figuras 41 e 42 apresentam esses resultados.

FIGURA 41 – MICROFOTOGRAFIAS DA FÓRMULA 1

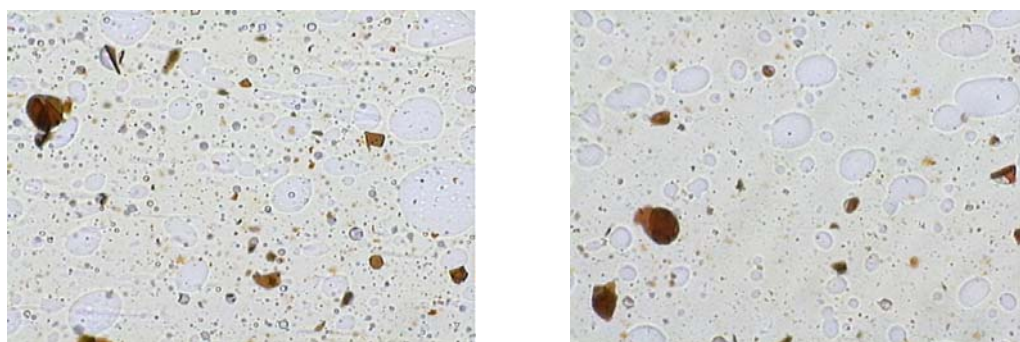
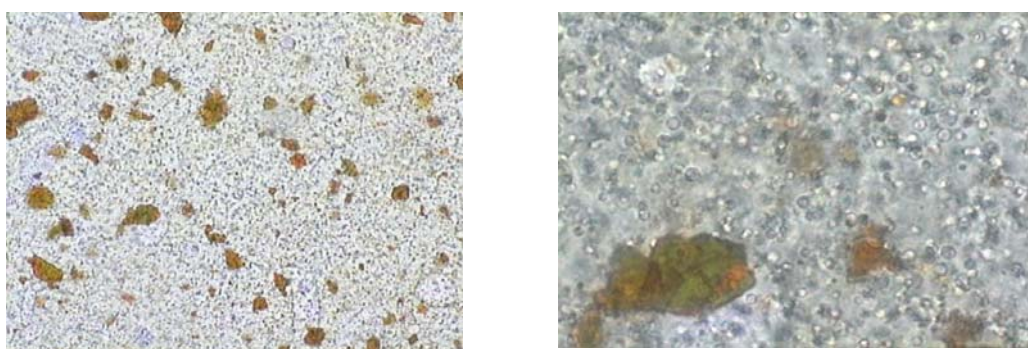


FIGURA 42 – MICROFOTOGRAFIAS DA FÓRMULA 2



Analisando-se as microfotografias da fórmula 1, nota-se a presença de glóbulos grandes, de formato disforme e de diversos tamanhos. Em contrapartida, a

fórmula 2 apresenta-se muito mais homogênea, com glóbulos pequenos, com formatos semelhantes, e distribuição uniforme.

Essas características indicam uma melhor estabilidade da fórmula 2, que estará menos sujeita a separação de fases e desintegração do produto.

A irregularidade na fórmula 1 pode ser explicada em razão das diferenças de densidade dos seus constituintes, que não permitem a mistura perfeita entre eles. Além disso, sabe-se que o grau de hidrofobicidade pode diferir entre os compostos oleosos. Um óleo pode ser mais ou menos hidrofóbico que outro, embora ambos sejam substâncias lipofílicas. Talvez por essas razões existam glóbulos grandes que não se homogeneizaram com os demais constituintes oleosos da fórmula.

Considerando que na fórmula 2 não há vaselina e a concentração do silicone é baixa, há uma indicação que esses dois compostos são determinantes para a não homogeneidade do sistema formado.

As partículas de coloração marrons-avermelhadas presentes em ambas as formulações podem ser impurezas do próprio óleo de *B.orellana*, ou partículas de mica dispersas no sistema.

6 CONCLUSÕES

O óleo de *B. orellana* foi extraído com bom rendimento por Soxhlet, assim como cristais de coloração vermelho-púrpura foram obtidos durante a extração clorofórmica. Embora não fosse objetivo inicial do trabalho, mas em razão da grande quantidade obtida, caracterizou-se esse cristal como sendo o corante bixina, pelas análises de ponto de fusão, espectroscopia de IV e RMN ^1H e ^{13}C .

O comportamento reológico do óleo mostrou que ele se apresenta com boas propriedades para a aplicação cutânea, indicando uma distribuição de forma homogênea e uniforme, em uma camada fina, fornecendo um aspecto sedoso ao toque.

Quando comparado com o óleo de amêndoas na análise de espalhabilidade, o óleo de *B. orellana* mostrou-se bastante semelhante, ou seja, sua viscosidade permite que sua aplicação sobre uma superfície seja fácil, sem oferecer resistência ao movimento.

Pelo método espectrofotométrico, foi determinado um FPS 6 para o óleo. Já se conhecia a propriedade de absorção de radiação UV desse produto, mas nesse trabalho pôde-se determinar seu fator de proteção *in vitro*, ainda que não seja conclusivo, visto que são necessários testes *in vivo* para confirmação desse valor.

A espectroscopia de IV permitiu caracterizar grupamentos químicos como hidroxilas, metilas, metilenos alifáticos e carbonilas do óleo em estudo. Em relação aos ácidos graxos, pôde-se determinar a presença de ácidos graxos insaturados, como linoléico e oléico, além do ácido aracdônico, que ainda não havia sido relatado nas literaturas consultadas.

A atividade antimicrobiana não foi identificada pelos métodos de difusão em ágar e CMI frente às cepas testadas. Embora não se possa excluir essa atividade no óleo, visto que somente oito cepas foram avaliadas, a maioria dos trabalhos sobre ação antimicrobiana de *B. orellana* trazem resultados positivos somente para outras partes da planta, como folhas e frutos.

Em relação à ação antioxidante, pelo ensaio fosfomolibdênico, o óleo apresentou atividade antioxidante semelhante à rutina. As análises cromatográficas realizadas permitiram a visualização de diversos compostos com essa atividade, especialmente os tocotrienóis e tocoferóis, identificados por CLAE. O composto “X”

corresponde, de acordo com os dados de RMN ^1H e ^{13}C , à substância δ tocotrienol, confirmando informações de literatura que relatam que *B. orellana* é uma das plantas com maior quantidade dessa substância.

A formulação cosmética sugerida para aplicação do óleo foi um gloss labial, visto que: é um óleo que apresenta boa espalhabilidade; fornece cor ao produto, evitando assim o uso de corantes sintéticos; é hidratante por formar um filme oclusivo; tem propriedades anti-radicais livres e fator de proteção solar. Dessa forma, conseguiu-se agregar valor ao óleo estudado, aproveitando suas propriedades identificadas. Duas fórmulas foram propostas, uma mais fluida e outra mais consistente. Ambas apresentaram-se com boas características para aplicação e bastantes semelhantes do ponto de vista reológico. Em relação à espalhabilidade, a fórmula mais fluida é aplicada com mais facilidade em razão de sua baixa viscosidade. Em contrapartida, apresenta-se pouco homogênea, pois as microfotografias da fórmula mais viscosa permitiram visualizar glóbulos menores, com formatos uniformes e mais bem distribuídos.

REFERÊNCIAS

ADELMANN, J. **Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante**. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

AGNER, A. R.; BARBISAN, L. F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D.M.F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 10, p. 1687-1693, 2004.

AGRICULTURA na Paraíba gera riqueza para exportadores. [Paraíba], 13 jun. 2005. Disponível em: <<http://www.paraiba.com.br/noticias.shtml?13610>> Acesso em: 22 fev. 2006.

AIYAR, S.S. The seeds of *Bixa orellana*. **Journal of American Pharmaceutical Association (1912-1977)**, v. 11, p. 999-1003, 1922.

ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: Interesse e Aplicações na Área Cosmético-Farmacêutica. **Revista Cosmetics & Toiletries**, Campinas, v.14, n.1, p.47-50, jan/fev 2002.

ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos**. Rosário: Corpus, 2004. p. 41-45.

ANVISA. Resolução nº 79 de 28 de agosto de 2000. Estabelece a definição e Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes e outros com abrangência neste contexto. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 ago. 2000.

ARBOS, K. A. **Estudo do Potencial Antioxidante de vegetais da família Cruciferae de diferentes cultivos**. Curitiba, 2004. 86 f. Dissertação (Mestrado em

Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BABY, A. R.; MACIEL, C. P. M.; SANTOS, I. M. N. S.; DIAS, T. C. de S.; KANEKO, T.M; CONSIGLIERI V. O.; VELASCO, M. V. R. Uso de extratos de plantas em produtos cosméticos. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 17, n. 1, p. 78-82, jan/fev 2005.

BARBOSA FILHO, J.M.; SILVA FILHO, R.N.; LIRA, B.F.; et al. Teor de bixina em quatro variedades de *Bixa orellana* L. cultivadas na Paraíba. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 7/8, p. 41-47, 1998.

BARBOSA FILHO, J.M. *Bixa orellana*: retrospectiva de usos populares, atividades biológicas, fitoquímica e emprego na fitocosmética, no continente Americano. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DO URUCUM, 2006, João Pessoa. **Anais**. João Pessoa: EMEPA, 2006. 1 CD-ROM

BARROSO, G. M.; et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1978. v.1. p. 178.

BASTOS, A. R. R.; CARVALHO, J. G. de; ASSIS, R. P. de; CECÍLIO FILHO, A. B. Marcha de absorção de nutrientes em urucum (*Bixa orellana* L.) “tipo cultivado” piave vermelha em fase de viveiro. **Cerne**, v. 5, n. 2, p. 76-85, 1999.

BAUTISTA, A. R. P. L.; MIRANDA, M. S.; BATISTA, M. S.; MOREIRA, E. L. T.; SILVA, I. M. da; GOMES, I. C. S. Avaliação da toxicidade oral subcrônica da bixina para ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, abr./jun. 2004.

BIANCO, E.M. **Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesalpiaceae**. Curitiba, 2003. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. 20. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1980. p. 782-783.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BONFIM, M. P.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; DIAS, N. O.; VILA, M. T. R. Colheita e processamento de urucueiros. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DO URUCUM, 2006, João Pessoa. **Anais**. João Pessoa: EMEPA, 2006. 1 CD_ROM.

BOUVIER, F; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, p. 2089-2091, 2003.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991.

CARVALHO, M. G. de; et al. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 21, n. 6, 1998.

CARVALHO, P. R. N. Urucum: avanços tecnológicos e perspectivas. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 49, n. 1-S, p. 71-73, 1999.

CAVIN, A.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O.. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. **Planta Médica**, v. 64, p. 393-396, 1998.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H.J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

COELHO, A.M.S.P.; SILVA, G.A. de; VIEIRA, O.M.C.; CHAVASCO, J.K. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (urucum). **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 47-54, jan/dez 2003.

CONFORTI, F.; STATTI, G.A.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. **Fitoterapia**, v. 73, p. 479-483, 2002.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Resolução Normativa nº 1/78. Resolve grupar os corantes inorgânicos e orgânicos, naturais e sintéticos de acordo com a área de aplicação, e estabelece restrições e exigências aplicáveis a esses grupos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 out. 1978.

CORRÊA, M. Pio; PENNA, Leonam de Azeredo (Col.). **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v. 6. p.358-359.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975.

COSTA, C. L. S. da; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 149-152, 2005.

CRONQUIST, A.J. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981.

DI MAMBRO, V. M.; MARQUELE, F. D.; FONSECA, M. J. V. Avaliação *in vitro* da ação antioxidante em formulações antienvhecimento. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 17, n. 4, p. 74-78, jul.-ago. 2005.

EBDA – Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S. A. **Cultivo de urucum cresce na região extremo sul**. Set./out. 2002. Disponível em: <<http://www.ebda.ba.gov.br/setout02mat-8.htm>> Acesso em: 24 jun. 2005.

ELIAS, M. E. A.; SCHROTH, G.; MACEDO, J. L. V.; MOTA, M. S. S.; D'ANGELO, S. A. Mineral nutrition, growth and yields of annatto trees (*Bixa orellana*) in agroforestry on an Amazonian ferralsol. **Experimental Agriculture**, v. 38, p. 277-289, 2002.

ESTEVE, M. M.; KRIESTEN, R. M. Estudo de um complexo ativo para prevenção do envelhecimento cutâneo. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 2, n.1, jan/fev 1990, p. 31-40.

EVANS, W. C. **Trease and Evans Pharmacognosy**. 13th ed. London: Beillière Tindall, 1992.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre e Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999.

FIGUEIRAS, T. S.; PEIXOTO, A. L.. Flora e vegetação do Brasil na carta de Caminha. **Acta Botânica Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 263-272, 2002.

FLEISCHER, T. C.; AMEADE, E. P. K.; MENSAH, M. L. K.; SAWER, I. K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 136-138, 2003.

FONSECA, A. de.; PRISTA, L. N. **Manual de terapêutica dermatológica e cosmetologia**. São Paulo: Roca, 1984.

FRANQUILINO, E. Em ritmo de expansão. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 18, p. 7-9, mar. 2006. Edição Temática Especial.

FREGA, N.; MOZZON, M.; BOCCI, F. Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gás chromatography-mass spectrometry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 12, p. 1723-1727, 1998.

FRANCO, C. F. de O. **Mercado de Urucum (*Bixa orellana*) no Brasil**. [2002?]. Disponível em: <http://www.emepa.org.br/uruum_mercado.php> Acesso em: 31 mai. 2005.

FRANCO, C. F. de O.; SILVA, F. de C. P. da; CAZÉ FILHO, J.; et al. **Urucuzeiro: agronegócio de corantes naturais**. João Pessoa: Emepa, SAIA, 2002. 120 p.

FURTADO, M. Corantes: indústria de alimentos adere aos corantes naturais. **Revista Química e Derivados**, 421. ed, nov. 2003. Disponível em: <<http://www.quimica.com.br/revista/qd421/corantes3.htm>> Acesso em: 31 mai. 2005.

GALINDO-CUSPINERA, V.; LUBRAN, M. B.; RANKIN, S. A. Comparison of volatile compounds in water and oil soluble annatto (*Bixa orellana* L.) extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2010-2015, 2002.

GARCÍA, V. M. N.; GONZALEZ, A.; FUENTES, M.; AVILES, M.; RIOS, M. Y.; ZEPEDA, G.; ROJAS, M. G. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 85-88, 2003.

GIULIANO, G.; ROSATI, C.; BRAMLEY, P. M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 513-516, dez. 2003.

GLÓRIA, M.B.A. Potencial de utilização do urucum. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DO URUCUM, 2006, João Pessoa. **Anais**. João Pessoa: EMEPA, 2006. 1 CD_ROM.

GUERRA FILHO, S. S.; FANAN, S. Visão cosmética dos radicais livres. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 6, n. 2, p. 51-54, mar./abr. 1994.

HAILA, K. M.; LIEVONEN, S. M.; HEINONEN, M. I. Effects of lutein, lycopene, annatto, and γ -tocopherol on autoxidation of triglycerides. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2096-2100, 1996.

HARDER, M. N. C. **Efeito do urucum (*Bixa orellana*) na alteração da coloração de gema e diferença no nível de colesterol e vitamina A pré e pró-formada em ovos de poedeiras**. São Paulo, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de São Paulo.

HIRATA, L. L. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, Cesalpiniaceae, em serum.** Curitiba, 2004, 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná.

HIRAYAMA, K. B.; SPERIDIÃO, P. G. L.; FAGUNDES NETO, U. Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa. **The Eletronic Journal of Pediatric Gastroenterology**, v. 10, n. 3, sep 2006.

INGRAM, J. S.; FRANCIS, B. J. The annatto tree (*Bixa orellana* L.): a guide to its occurrence, cultivation, preparation and uses. **Tropical Science**, v. 11, n. 2, p. 97-102, 1969.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal.** 8. ed. São Paulo: Nacional, 1987. p. 482-485.

KALIL, M. Índio righ-tech. **Revista Isto é Gente**, São Paulo, 302. ed, 30 mai. 2005. Disponível em: <http://www.terra.com.br/istoegente/302/reportagens/indio_high_tech.htm> Acesso em: 22 fev. 2006.

KANJILAL, P. B.; SINGH, R. S. Agronomic evaluation of annatto (*Bixa orellana* L.). **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 3, n. 3, p. 13-17, 1995.

KIOKIAS, S.; GORDON M. H.; Antioxidant properties of annatto carotenoids. **Food Chemistry**, v. 83, p. 523-529, 2003.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL JR, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.** 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1993.

LABA, D. (Ed). **Rheological properties of cosmetics and toiletries.** New York: Marcel Dekker, 1993. 425p.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; STRINGHETA, P. C.; TINOCO, A. L. A.; SILVA, J. F. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

LOWE, N. J.; BREEDING, J. Sunscreen predictive assays. **Cosmetics & Toiletries**, v. 98, p. 95-98, 1983.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. d'A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 61, n. 3, p. 121-124, 1986.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V. de; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E. de; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761-770, nov./dez. 2006.

LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry**, v. 75, p. 197-202, 2001.

MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; JIMÉNEZ, A. M.; RUGGIERI, S.; FREGA, N.; STRABBIOLI, R.; MURCIA, M. A. Antioxidant properties of mediterranean spices compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 9, p. 1412-1419, 2001.

MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, I. L. Ácidos graxos e algumas oleaginosas tropicais em ocorrência no nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 15, n. 3, p. 181-185, 1992.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1050-1054, 1997.

MIRANDA, M. S. **Importância do urucum como condimento**. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DO URUCUM, 2006, João Pessoa. **Anais**. João Pessoa: EMEPA, 2006. 1 CD_ROM.

MORENO, M. I. N.; ISLA, M. I.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of própolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 109-114, 2000.

OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1996.

OLIVEIRA, J. S. **Purificação de Compostos de Urucum por Processo Absortivo**, Florianópolis, 2005, 185 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina.

PAIVA, S. R. de; LIMA, L. A.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 76, n. 3, p. 499-504, 2004.

PAUMGARTTEN, F. J. R.; CARVALHO, R. R. de; ARAÚJO, I. B.; PINTO, F. M.; BORGES, O. O.; SOUZA, C. A. M.; KURIYAMA, S. N. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 11, p. 1595-1601, 2002.

PERECIN, M. B.; BOVI, O. A.; MAIA, N. B. Pesquisa com plantas aromáticas, medicinais e corantes: o papel do Instituto Agrônômico. **O Agrônômico**, Campinas, V. 54, n. 2, p. 21-24, 2002.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M-C.; CHIVOT, M. **Estética cosmética**: cosmetologia, biologia geral, biologia da pele. São Paulo: Andrei, 1998.

PINO, J. A.; CORREA, M. T. Chemical composition of the essential oil from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 66-67, mar./apr. 2003.

PLANTAMED. Urucum. Disponível em: <http://www.plantamed.com.br/ESP/Bixa_orellana.htm> Acesso em: 25 mai. 2005.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

RANJANA, G.; RAUF, A.; AHMAD, M.A.; AHMAD, F.; OSMAN, S.M. Chemical screening of seed oils. **Journal of the Oil Technologists' Association of India**, v. 15, n. 1, p. 6-7, 1983.

REBOUÇAS, T. N. H.; VILA, M. T. R.; SÃO JOSÉ, A. R.; BONFIM, M. P. Nutrição e adubação em urucueiros (*Bixa orellana* L.). In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DO URUCUM, 2006, João Pessoa. **Anais**. João Pessoa: EMEPA, 2006. 1 CD_ROM.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. 2. ed. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 2001. p. 201-205.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e biotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

SATYANARAYANA, A.; PRABHAKARA RAO, P. G.; RAO, D. G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). **Journal of Food Sciences Technology**, v. 40, n. 2, p. 131-141, 2003.

SCOTTER, M. J.; THORPE, S. A.; REYNOLDS, S. L.; WILSON, L. A.; STRUTT, P. R. Characterization of the principal colouring components of annatto using high

performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Food Additives and Contaminants**, v. 11, n. 3, p. 301-315, 1994.

SILVA, D. H. S. **Constituintes químicos de *Iryanthera sagotiana* e *Iryanthera lancifolia***. São Paulo, 1997. 147 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal de São Paulo.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94 -103, 1999.

SILVA, J. C. B. Novas Conquistas para o Setor. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 18, n. 1, p. 20, jan./fev. 2006. Coluna Notícias da ABIHPEC.

SILVA, M. P. F. da; LEÃO, M. B. C. L.; CARDOSO JR, C. M. de A. Isolamento e Análise da Possível Ação Carcinogênica da Bixina comparada com a de outros Corantes. In: 23º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, maio 2000. Disponível em: <<http://www.sbq.org.br/ranteriores/23/resumos/1297/>> Acesso em: 22 jan. 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SOLARZANO, G. R. de. **El cultivo de onoto em Venezuela**. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuárias, Venezuela, n. 36, abr./jun. 1991. Disponível em: <<http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd36/texto/cultivo.htm>> Acesso em: 24 jun. 2005.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre e Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999.

STRINGHETA, P. C. Usos do corante e derivados do urucum. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DO URUCUM, 2006, João Pessoa. **Anais**. João Pessoa: EMEPA, 2006. 1 CD_ROM.

STROHSCHHEIN, S.; et al. Separation and identification of tocotrienol isomers by HPLC – MS and HPLC – NMR coupling. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 6, 1999.

TINOCO, S. M. B.; SICHIERI, R.; MOURA, A. S.; SANTOS, F. da S.; CARMO, M. das G. do T. Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos trans do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 3, p. 525-534, mar. 2007.

VASCONCELLOS, J. A. **Alimentos funcionales**: conceptos y beneficios para la salud. The World of Food Science. Disponível em: <http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm> Acesso em: 12 jul. 2005.

VOEGELI, R.; MEIER, J.; DOPPLER S.; RIES, P. Defesa contra espécies reativas de oxigênio: modelos *in vitro*. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 4, n. 5, p. 49-55, set./out. 1992

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M.; DALMAZ, A. C. Parâmetros físicos do estudo das estabilidade das emulsões. **Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 47-58, jul./dez. 2001.

ZOLLO, P.H.A.; BIYITI, L.; TCHOUMBOUGNANG, F.; MENUT, C.; LAMARTY G., BOUCHET, P. Aromatic plants of tropical central África. Part XXXII – chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of cameroon. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 13, p. 107-114, 1998.